

# Regulation der Stressadaptation in Cyanobakterien – Untersuchungen zur Funktion von 6S RNA und Sigmafaktoren

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Beate Heilmann

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
2. Prof. Dr. Ilka Maria Axmann
3. Prof. em. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2019



*In allem, was die Natur hervorbringt, ist etwas Bewundernswertes.*

(Aristoteles)



## Zusammenfassung

Die 6S RNA ist eine hoch abundante, stabile sRNA, die in Prokaryoten maßgeblich an der Regulation der globalen Genexpression zur Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen beteiligt ist. In *E. coli* akkumuliert sie im Laufe des Zellwachstums und unterstützt durch Komplexbildung mit der  $\sigma^{70}$ -RNA Polymerase die Transkriptionsinitiation  $\sigma^{38}$ -abhängiger Promotoren. Unter verbesserten Nährstoffbedingungen dient sie als *Template* für die Synthese von pRNAs, welche die Dissoziation der 6S RNA-RNA Polymerase-Komplexe und das Wiederauwachen der Zellen zur Folge hat. Für cyanobakterielle 6S RNA-Homologe wurde ein gegenläufiges Akkumulationsverhalten beschrieben, jedoch konnten anhand von *in vitro*-Analysen mit cyanobakterieller 6S RNA und *E. coli*-RNA Polymerase große funktionelle Übereinstimmungen zur *E. coli*-6S RNA nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die regulative Funktion von 6S RNA in Cyanobakterien am Beispiel des Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 beleuchtet. Die Menge an 6S RNA-Transkripten ging in der stationären Wachstumsphase unter phototrophen Bedingungen leicht zurück, während unter photoheterotrophen Bedingungen eine stärkere Abnahme gemessen wurde. Physiologische Untersuchungen einer 6S RNA-Deletionsmutante ( $\Delta$ ssaA) und einer 6S RNA-Überexpressionsmutante (6S+) ergaben eine erhöhte Lichtsensitivität für  $\Delta$ ssaA, welche auf oxidativen Stress zurückzuführen sein könnte. Die Thermotoleranz der Zellen war bei der subletalen Temperatur von 40 °C durch Abwesenheit von 6S RNA hingegen nicht beeinträchtigt. Die Regeneration nach Stickstoffmangel lief in  $\Delta$ ssaA im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamt ab. Dieser Phänotyp äußerte sich physiologisch durch eine Verzögerung der Reassemblierung der Phycobilisomen und des Abbaus von Glykogen sowie durch eine verminderte photosynthetische Aktivität in  $\Delta$ ssaA. Diese Beobachtungen konnten durch vergleichende *Microarray*-Analysen verifiziert werden. Während sich die Genexpression in  $\Delta$ ssaA unter Stickstoffmangelbedingungen kaum vom Wildtyp unterschied, waren Gene kodierend für die ATP-Synthase, ribosomale Proteine, Photosynthese-Komplexe und Phycobilisomen während der Regeneration in  $\Delta$ ssaA signifikant negativ exprimiert. Da für wichtige Stickstoffregulatoren keine differentielle Expression nachgewiesen wurde, wird vermutet, dass es sich um einen 6S RNA-abhängigen Regulationsmechanismus handelt, der zusätzlich zum NtcA-Regulationsnetzwerk auftritt. Eine charakteristische Expressionskinetik wurde für die sRNA SyR11 ermittelt, die in  $\Delta$ ssaA stark runterreguliert war. *In vivo-pulldown*-Analysen der RNA Polymerase zeigten, dass 6S RNA während der Regeneration die Rekrutierung des Hauptsigmafaktors SigA begünstigt und die Komplexdissoziation von Sigmafaktoren der Gruppe 2, SigB und SigC, beschleunigt. Derweil blieb das 6S RNA-Transkriptlevel unter Stickstoffmangelbedingungen nahezu konstant. Die *in vivo* Synthese von pRNA-Transkripten konnte für *Synechocystis*-6S RNA – trotz Verwendung einer hoch sensitiven Methode – nicht nachgewiesen werden. Ferner schien 6S RNA für die Anpassung an Langzeitstickstoffmangel nicht essentiell zu sein. Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Bedeutung von 6S RNA für die Adaptation an Stressbedingungen in Cyanobakterien, einschließlich der hypothetischen Regulation der Histidinkinase Hik34 und Hitzeschockproteine, diskutiert.



# Abstract

The 6S RNA is a highly abundant, stable sRNA, which is extensively involved in regulating the global gene expression for adaptation to changing environmental conditions in prokaryotes. In *E. coli*, 6S RNA accumulates throughout growth and supports the transcription of  $\sigma^{38}$ -dependent promoters by forming stable complexes with the  $\sigma^{70}$ -RNA polymerase. Under conditions of nutritional upshift 6S RNA serves as a template for the synthesis of pRNA transcripts, resulting in the dissociation of the 6S RNA-RNA polymerase-complexes and outgrowth from stationary phase. For cyanobacterial 6S RNA homologs an opposite accumulation pattern has been described. However, *in vitro* pulldown analyses using cyanobacterial 6S RNA and *E. coli* RNA polymerase revealed highly functional analogies with *E. coli* 6S RNA.

In this work, *Synechocystis* sp. PCC 6803 was used as a model organism to study the regulative function of 6S RNA in cyanobacteria. During stationary phase, measurements under phototrophic conditions showed a slight reduction in 6S RNA transcript levels, while a stronger decline was observed under photoheterotrophic conditions. Physiological studies using a 6S RNA deletion mutant ( $\Delta$ ssaA) and a 6S RNA overexpression mutant (6S+) indicated an increased light sensitivity for  $\Delta$ ssaA, which might be caused by oxidative stress. In contrast, the thermo-tolerance of the cells to the sublethal temperature of 40 °C was not affected in the absence of 6S RNA. The recovery from nitrogen depletion was considerably delayed in  $\Delta$ ssaA compared to the wild type. This phenotype was physiologically characterized by a decelerated phycobilisome reassembly and glycogen degradation as well as reduced photosynthetic activity in  $\Delta$ ssaA. Comparative transcriptome analysis verified these observations. While similar gene expression patterns were measured in  $\Delta$ ssaA and wild type under nitrogen depletion, genes encoding ATP synthase, ribosomal proteins, photosystem components and phycobilisomes were significantly negatively affected in the mutant strain during recovery. Given the fact that no differences in gene expression were detected for nitrogen regulators, it can be assumed, that the 6S RNA-dependent regulatory mechanism is acting in addition to the NtcA regulatory network. A distinctive accumulation kinetics was found for the sRNA SyR11, exhibiting significantly down-regulated transcript levels in  $\Delta$ ssaA under nitrogen starvation and recovery. *In vivo* pulldown analyses of the RNA polymerase revealed a promoting effect of 6S RNA on the recruitment of the housekeeping sigma factor SigA as well as on the complex dissociation of group 2 sigma factors, SigB and SigC. Meanwhile, the 6S RNA transcript level remained nearly constant during nitrogen deficiency. Despite using a highly sensitive method, the *in vivo* synthesis of pRNA transcripts could not be detected for *Synechocystis* 6S RNA. Moreover, 6S RNA appeared not to be essential for adaptation to long-term nitrogen starvation. The results are discussed regarding the role of 6S RNA for the adaptation to stress conditions in cyanobacteria, including the hypothetical regulation of the histidine kinase Hik34 and heat shock proteins.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	i
Tabellenverzeichnis .....	iii
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Welt der Cyanobakterien .....	1
1.1.1. Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 als Modellorganismus.....	1
1.2. Transkriptionsregulation in Prokaryoten .....	2
1.2.1. Regulatorische RNAs in Prokaryoten.....	2
1.2.2. Kleine regulatorische RNAs in Cyanobakterien .....	6
1.3. 6S RNA .....	7
1.3.1 Struktur und Funktion in Prokaryoten.....	8
1.3.2 6S RNA in Cyanobakterien .....	14
1.3.3 6S RNA Homologe in Eukaryoten .....	17
1.4. Sigmafaktoren in Prokaryoten.....	17
1.4.1 Sigmafaktoren in <i>Synechocystis</i> .....	19
1.5. Adaptation an Stickstoffmangel .....	22
1.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	24
2. Ergebnisse.....	25
2.1. Wachstumsphasen-abhängige 6S RNA-Transkriptakkumulation unter phototrophen und photoheterotrophen Bedingungen .....	25
2.2. Charakterisierung der Funktion von 6S RNA unter diversen Wachstums- und Stressbedingungen .....	28
2.2.1 Konstruktion einer $\Delta$ ssaA-Mutante .....	28
2.2.2 Konstruktion einer $\Delta$ ssaA-C Komplementationsmutante .....	30
2.2.3 Konstruktion einer 6S(+)-Mutante .....	30
2.2.4 Wachstum unter photoautotrophen und photoheterotrophen Bedingungen.....	31
2.2.5 Analyse der Lichtsensitivität von $\Delta$ ssaA .....	32
2.2.5.1 Lichtsensitivität von $\Delta$ ssaA in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode.....	34
2.2.6 Einfluss von 6S RNA auf die Thermotoleranz bei der subletalen Temperatur von 40 °C .....	36
2.2.7 Einfluss von 6S RNA auf die Stressantwort bei Stickstoffmangel und Regeneration..	37
2.2.7.1 Physiologische Charakterisierung der $\Delta$ ssaA-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und während der Regeneration (+N) ...	39
2.2.7.1.1. Pigmentzusammensetzung .....	39
2.2.7.1.2. Photosynthetische Parameter .....	41
2.2.7.1.3. Glykogenabbau .....	43
2.2.7.2 Vergleichende <i>Microarray</i> -Analyse von Wildtyp und $\Delta$ ssaA unter Stickstoffmangel und während der Regeneration .....	44
2.2.7.2.1 Analyse differentiell exprimierter Gene unter Stickstoffmangelbedingungen (0h +N).....	45



2.2.7.2.2	Analyse differentiell exprimierter Gene während der Regeneration .....	46
2.2.7.2.3	Genexpressionsunterschiede ausgewählter Gene im zeitlichen Verlauf .....	50
2.2.7.2.4	Expressionsanalyse der Sigmafaktoren.....	51
2.2.7.2.5	Expressionsverhalten wichtiger Markergene für die Anpassung an Stickstoffmangel.....	53
2.2.7.2.6	Verifizierung der Daten der <i>Microarray</i> -Analyse für die sRNA SyR11 ....	53
2.2.7.3	Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und intrazelluläre Konzentration der Sigmafaktoren unter Stickstoffmangel und während der Regeneration .....	55
2.2.7.3.1	Konstruktion und Verifizierung einer WT-RNAP-HIS- und einer $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS-Mutante.....	55
2.2.7.3.2	<i>In vivo</i> -Pull-down-Analyse: Intrazelluläre Konzentration der Sigmafaktoren und ihre Rekrutierung durch die RNAP .....	57
2.2.7.4	Analyse der 6S RNA-Transkriptakkumulation unter Stickstoffmangel und während der Regeneration .....	60
2.2.7.5	Analyse der pRNA-Synthese unter Stickstoffmangel und während der Regeneration .....	62
2.2.7.6	Wachstum unter Langzeitstickstoffmangel.....	64
3.	Diskussion .....	67
3.1.	6S RNA-Akkumulationsverhalten in <i>Synechocystis</i> .....	67
3.2.	6S RNA - ein Regulator zur Anpassung an oxidativen Stress? .....	68
3.3.	6S RNA hat keinen Einfluss auf die Thermotoleranz gegenüber subletalen Temperaturen.....	70
3.4.	Die Rolle der 6S RNA bei der Anpassung an Stickstoffstress und anschließender Regeneration .....	71
3.4.1.	Einfluss auf physiologische und photosynthetische Parameter .....	71
3.4.2.	Einfluss auf die Genexpression .....	73
3.4.2.1	6S RNA zeigt geringen Effekt unter Stickstoffmangel – beschleunigt jedoch den Transkriptionswechsel während der Regeneration .....	73
3.4.2.2	Die Rolle der sRNAs und das regulatorische Potenzial von SyR11.....	76
3.4.3.	Einfluss auf die Genexpression, Rekrutierung und Proteingehalt der Sigmafaktoren .....	77
3.4.4.	Hohe Konstanz des 6S RNA-Transkriptlevels unter Stickstoffstress.....	80
3.4.5.	Kein Nachweis <i>in vivo</i> -generierter pRNA-Transkripte – daher auch keine Synthese? .....	81
3.4.6.	6S RNA ist für die Anpassung an Langzeitstickstoffmangel nicht essentiell.....	82
3.5.	Schlussbetrachtung .....	83
4.	Material und Methoden .....	86
4.1	Material .....	86
4.1.1.	Mikroorganismen .....	86
4.1.1.1.	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	86
4.1.1.2.	Cyanobakterienstämme und -mutanten.....	86
4.1.2.	Plasmide .....	87
4.1.3.	Medien, Stammlösungen und Puffer.....	88
4.1.4.	Chemikalien .....	88
4.1.5.	Radiochemikalien .....	90

4.1.6.	Molekulargewichtsmarker.....	90
4.1.7.	Enzyme .....	91
4.1.8.	Synthetische Oligonukleotide.....	91
4.1.9.	Antikörper.....	93
4.1.10.	Kits und sonstige Materialien .....	93
4.1.11.	Laborgeräte .....	94
4.1.12.	Software und Datenbanken.....	96
4.2	Methoden.....	97
4.2.1	Allgemeine mikrobiologische und physiologische Methoden.....	97
4.2.1.1	Steriles Arbeiten.....	97
4.2.1.2	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	97
4.2.1.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	99
4.2.1.4	Bestimmung der Dichte in Flüssigkulturen .....	99
4.2.1.5	Absorptionsspektren ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> .....	99
4.2.1.6	Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses .....	100
4.2.1.7	Tropftests ( <i>Spot assay</i> ).....	100
4.2.1.8	Stickstoffentzug aus dem Medium ( <i>Step down</i> ) .....	100
4.2.1.9	Ergänzung des BG11-Mediums -N mit Stickstoff (Regeneration) .....	101
4.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	101
4.2.2.1	DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	101
4.2.2.2	Reinigung von PCR-Produkten .....	101
4.2.2.3	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion ..	101
4.2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	102
4.2.2.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	102
4.2.2.6	DNA-Sequenzierung .....	102
4.2.2.7	Transformation von <i>E. coli</i> .....	102
4.2.2.8	Transformation von <i>Synechocystis</i> .....	103
4.2.2.9	Konjugation von <i>Synechocystis</i> .....	103
4.2.3	Biochemische Methoden zur RNA-Analytik.....	104
4.2.3.1	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i> .....	104
4.2.3.2	Denaturierende Elektrophorese von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar-Blotting.....	105
4.2.3.3	Denaturierende Elektrophorese von RNA in Harnstoff-Polyacrylamidgelen .....	106
4.2.3.4	Elektro-Blotting von RNA (Northern Blot).....	107
4.2.3.5	<i>In vitro</i> -Transkription und Reinigung von RNA.....	107
4.2.3.6	Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Northern Blot-Hybridisierungen .....	108
4.2.3.7	Northern Blot-Hybridisierung (radioaktiv) .....	109
4.2.3.8	Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden für Northern Blot-Hybridisierungen .....	110
4.2.3.9	Northern Blot-Hybridisierung (Digoxigenin) .....	110

4.2.3.10	Nichtdenaturierende PAGE und Elektro-Blotting zur Detektion kleiner RNA-Moleküle / pRNAs .....	110
4.2.3.11	<i>Microarray</i> -Hybridisierung und Auswertung .....	111
4.2.4	Biochemische Methoden zur Protein-Analytik.....	112
4.2.4.1	Zellernte und -aufschluss von <i>Synechocystis</i> .....	112
4.2.4.2	Herstellung von Zelllysaten für Pigmentbestimmungen.....	112
4.2.4.3	Herstellung von Zelllysaten für <i>in vivo-pulldown</i> Analysen .....	113
4.2.4.4	Bestimmung des Phycobiliproteingehalts.....	114
4.2.4.5	Bestimmung des Chlorophyll $\alpha$ -Gehalts.....	114
4.2.4.6	Bestimmung des Glykogengehalts .....	114
4.2.4.7	Isolation His-fusionierter Proteine mittels magnetischer Kügelchen ( <i>Dynabeads</i> ) – <i>in vivo-pulldown</i> -Analysen .....	116
4.2.4.8	DOC/TCA-Fällung von Proteinen .....	116
4.2.4.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford .....	117
4.2.4.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry.....	117
4.2.4.11	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry mit einem <i>Kit</i> .....	118
4.2.4.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	118
4.2.4.13	Tricin-SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow .....	118
4.2.4.14	Coomassiefärbung von Proteingelen .....	119
4.2.4.15	Immunoblot-Analyse (Western Blot) .....	119
4.2.4.16	Entfernen gebundener Antikörper ( <i>Stripping</i> ) .....	120
4.2.4.17	Messung der Sauerstoffentwicklung.....	120
4.2.4.18	77 K-Fluoreszenzemissionsspektroskopie.....	121
4.2.4.19	Fluoreszenzmikroskopie.....	121
	Literaturverzeichnis .....	122
	Anhang.....	137
	Abkürzungsverzeichnis.....	139
	Danksagung .....	143
	Selbstständigkeitserklärung .....	145
	Publikationsliste.....	147
	Lebenslauf .....	148



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 .....	2
Abbildung 1.2	Regulatorische RNAs und ihre Wirkmechanismen in Prokaryoten (Brantl, 2008). .....	3
Abbildung 1.3	Dreidimensionales Strukturmodell eines RNA-Protein-Komplexes in <i>E. coli</i> bestehend aus 6S RNA und $\sigma 70$ -RNAP-Holoenzym. ....	9
Abbildung 1.4	Schematisches Modell der 6S RNA-Funktionsweise und pRNA-Synthese in <i>E. coli</i> . ....	11
Abbildung 1.5	Sekundärstruktur der 6S RNA aus <i>Synechocystis</i> (Rediger et al., 2012). ....	16
Abbildung 1.6	Alignment der 6S RNA-Sequenzen von vier Cyanobakterien ( <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942, <i>Nostoc</i> PCC 7120, <i>Synechocystis</i> PCC 6803 und <i>Prochlorococcus</i> MED4) im Vergleich zur 6S RNA-Sequenz von <i>E. coli</i> . ....	17
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation in <i>E. coli</i> während des Wechsels von exponentiellem Wachstum zur stationären Phase. ....	19
Abbildung 1.8	Stressabhängige Rekrutierung von Sigmafaktoren der Gruppe 2 durch die RNAP in <i>Synechocystis</i> . ....	21
Abbildung 2.1	Untersuchung der 6S RNA-Transkriptmenge während phototrophen Wachstums von <i>Synechocystis</i> -Zellen. ....	26
Abbildung 2.2	Untersuchung der 6S RNA-Transkriptmenge während photoheterotrophen Wachstums von <i>Synechocystis</i> -Zellen. ....	27
Abbildung 2.3	Generierung einer $\Delta$ ssaA-Mutante in <i>Synechocystis</i> . ....	29
Abbildung 2.4	6S RNA Überexpression in <i>Synechocystis</i> . ....	30
Abbildung 2.5	Wachstumsanalyse von <i>Synechocystis</i> Wildtyp, $\Delta$ ssaA- und 6S(+)-Mutante in Flüssigkultur. ....	32
Abbildung 2.6	Tropftest zur Wachstumsanalyse von <i>Synechocystis</i> Wildtyp, $\Delta$ ssaA-, $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Mutante auf Agar-Festmedium. ....	33
Abbildung 2.7	Analyse der Lichtsensitivität von <i>Synechocystis</i> Wildtyp, $\Delta$ ssaA-, $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Mutante in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode. ....	35
Abbildung 2.8	Thermotoleranz von <i>Synechocystis</i> Wildtyp, $\Delta$ ssaA- und 6S(+)-Mutante. ....	36
Abbildung 2.9	Schematische Darstellung der dreiphasigen Versuchsdurchführung zur Analyse des Einflusses von 6S RNA auf die Adaptation bei wechselnder Stickstoffverfügbarkeit: Vorkultivierung, Stickstoffmangel (-N) und Regeneration (+N). ....	38
Abbildung 2.10	Vergleichende physiologische Charakterisierung von <i>Synechocystis</i> Wildtyp und $\Delta$ ssaA-Mutante unter Stickstoffmangel und Regeneration: Pigmentzusammensetzung. ....	40

Abbildung 2.11 Photosynthetische Parameter von <i>Synechocystis</i> Wildtyp und $\Delta$ ssaA-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration. ....	42
Abbildung 2.12 Glykogengehalt von <i>Synechocystis</i> Wildtyp und $\Delta$ ssaA-Mutante unter Stickstoffmangel und Regeneration. ....	43
Abbildung 2.13 Analyse der Expressionsunterschiede in Wildtyp und $\Delta$ ssaA nach siebentägiger Kultivierung unter stickstofffreien Bedingungen (0h +N). ....	46
Abbildung 2.14 Zeitlicher Verlauf der Transkriptakkumulation ausgewählter Gene während der Regeneration nach Stickstoffmangel. ....	50
Abbildung 2.15 Genexpressionsprofil der acht Sigmafaktoren (SigA-SigH) in $\Delta$ ssaA unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration. ....	52
Abbildung 2.16 Verifizierung der SyR11-Microarray-Genexpressionsdaten mittels Northern Blot-Analyse. ....	54
Abbildung 2.17 Generierung der His-tag Mutanten WT-RNAP-HIS- und $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS. ....	56
Abbildung 2.18 Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und Gehalt von SigA. ....	58
Abbildung 2.19 Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und Gehalt der Sigmafaktoren SigB, SigC und SigE. ....	59
Abbildung 2.20 Analyse der 6S RNA-Transkriptakkumulation unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regenerationsphase. ....	61
Abbildung 2.21 Northern Blot-Analyse der pRNA-Synthese in <i>Synechocystis</i> Wildtyp-Zellen während der Regeneration nach Stickstoffmangel. ....	63
Abbildung 2.22 Analyse der Adaptation von Wildtyp, $\Delta$ ssaA und $\Delta$ ssaA-C an Langzeitstickstoffmangel. ....	65
Abbildung 3.1 Zeitlicher Verlauf der Transkriptakkumulation von <i>hik34</i> während der Regeneration nach Stickstoffmangel. ....	75
Abbildung 3.2 Hypothetisches Schema zur 6S RNA-vermittelten Transkriptionsregulation von <i>hik34</i> und HSP unter Einbeziehung der Sigmafaktoren SigA, SigB und SigE. ....	85
Abbildung A.1 Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> Wildtyp, $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Mutante während der Regeneration nach Stickstoffmangel. ....	137
Abbildung A.2 Genomische Einordnung der unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration regulierten Genabschnitte in <i>Synechocystis</i> . ....	138

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Negativ und positiv regulierte Transkripte in <i>ΔssaA</i> während der Regeneration. ....	48
Tabelle 4.1 Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	86
Tabelle 4.2 Verwendete Plasmide.....	87
Tabelle 4.3 Chemikalien.....	88
Tabelle 4.4 Größenstandards.....	90
Tabelle 4.5 Verwendete Enzyme und Reaktions-Kits.....	91
Tabelle 4.6 Synthetische Oligonukleotide und Primer.....	91
Tabelle 4.7 Antikörper.....	93
Tabelle 4.8 Verwendete <i>Kits</i> und sonstige Materialien.....	93
Tabelle 4.9 Geräteliste.....	94
Tabelle 4.10 Software und Datenbanken.....	96





# 1. Einleitung

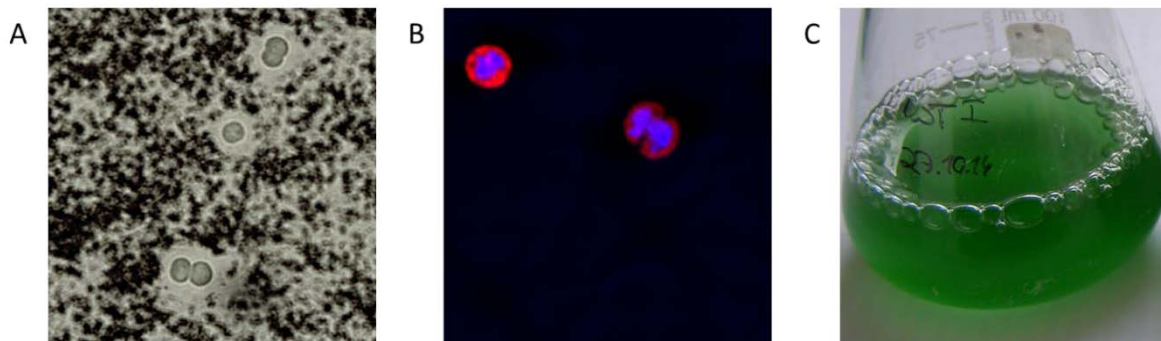
## 1.1. Die Welt der Cyanobakterien

Cyanobakterien werden im phylogenetischen Stammbaum des Lebens der Domäne der *Bacteria* zugeordnet und bilden dort eine eigene Abteilung. Die gramnegativen und phototrophen Bakterien bilden in Bezug auf ihre Verbreitung und ihre Beschaffenheit eine sehr heterogene Gruppe. Sie kommen in diversen aquatischen und terrestrischen Habitaten vor. So leben sie u. a. in Süßwasser, Salzwasser, Brackwasser, Hydrothermalquellen, im Boden sowie in extremen und nährstoffarmen Standorten (Fuchs, 2007), wie z. B. auf Gestein und in Eis der Polarregionen (Madigan & Martinko, 2006b). Zudem gehen einige Cyanobakterien Symbiosen mit Pflanzen ein und versorgen den Wirt mit organischen Verbindungen oder mit gebundenem Stickstoff (z. B. *Anabaena azolla*). Eine taxonomische Einteilung erfolgte u. a. durch Rippka *et al.* (1979) hauptsächlich auf Grundlage der morphologischen Beschaffenheit. Dabei wurden die verschiedenen Cyanobakterienarten in fünf Ordnungen (*Section I*: Ordnung Chroococcales; *Section II*: Pleurocapsales; *Section III*: Oscillatoriales; *Section IV*: Nostocales und *Section V*: Stigonematales) unterteilt. Die taxonomische Einteilung der Cyanobakterien befindet sich jedoch im stetigen Wandel, sodass zurzeit mehrere Taxonomiesysteme existieren. Das morphologische Auftreten ist sehr vielfältig. Cyanobakterien kommen als einzellige Organismen vor (z. B. *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942) oder bilden wenig- bis vielzellige Filamente (z. B. *Anabaena* sp. PCC 7120) oder Zellaggregate (z. B. *Gloeocapsa*). Die evolutive Entwicklung der ersten Cyanobakterien reicht weit zurück. Fossile, kalkhaltige Ablagerungen, sogenannte Stromatolithen, von Cyanobakterien sind mehr als 3,5 Millionen Jahre alt und bilden damit die ältesten oxygene Photosynthese betreibenden Mikroorganismen der Erde (Schopf & Walter, 1982). Die photosynthetische Leistung von Cyanobakterien hat maßgeblich zur Anreicherung von Sauerstoff in der Erdatmosphäre beigetragen (Madigan & Martinko, 2006b; Sidler, 2004). Darüber hinaus wird gemäß der Endosymbiontentheorie allgemein angenommen, dass Plastiden eukaryotischer Zellen durch die Aufnahme phototropher Symbionten (aus der Domäne der *Bacteria*) entstanden sind (Douglas, 2004; Madigan & Martinko, 2006a).

### 1.1.1. Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellorganismus

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) ist ein unizellulär-kokkenförmiges, 2-6 µm großes Cyanobakterium (Herdman *et al.* (2015); Abbildung 1.1), welches 1968 aus einem Süßwassersee in Kalifornien isoliert und in die Pasteur Culture Collection (PCC) aufgenommen wurde (Rippka *et al.*, 1979; Stanier *et al.*, 1971). Es erlangte eine besondere Bedeutung als Modellorganismus, da das *Synechocystis*-Genom als das erste Genom eines photosynthetischen Organismus bereits im Jahr 1996 komplett sequenziert wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Es besteht aus einem zirkulären Plasmid und sieben Chromosomen (Trautmann *et al.*, 2012), hat eine Gesamtgröße von 3,57 Mbp und besitzt ca. 3.200 proteinkodierende Gene (NCBI). *Synechocystis* lässt sich durch seine natürliche Kompetenz leicht

genetisch verändern (Grigorieva & Shestakov, 1982). Darüber hinaus zeichnet sich *Synechocystis* für sein motiles Wachstum aus und ist imstande, sowohl unter photoautotrophen als auch unter heterotrophen Lebensbedingungen zu wachsen. Demzufolge hat sich *Synechocystis* zu einem beliebten Modellorganismus für die Analyse der Photosynthese und des Metabolismus entwickelt und wurde in den letzten Jahren auch vermehrt für biotechnologische Anwendungen eingesetzt (u. a. Dexter *et al.* (2015); Ducat *et al.* (2011); Yu *et al.* (2013)).



**Abbildung 1.1. *Synechocystis* sp. PCC 6803** A: Lichtmikroskopische Aufnahme von *Synechocystis*-Zellen, gefärbt mit *India Ink*. 400-fache Vergrößerung. B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Synechocystis*-Zellen. Rote Färbung zeigt die Autofluoreszenz des Chlorophylls, blaue Färbung zeigt mit *Hoest*-Farbstoff angefärbte DNA. 1000-fache Vergrößerung. C: *Synechocystis*-Zellen in Flüssigkultur (Quelle: eigene Aufnahmen).

## 1.2. Transkriptionsregulation in Prokaryoten

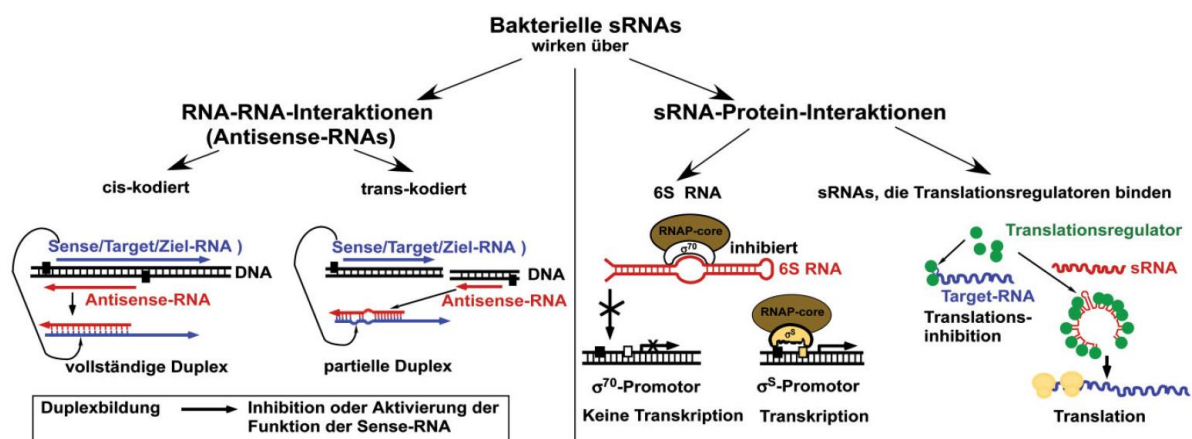
Prokaryoten sind häufig Veränderungen ihrer Umwelt ausgesetzt, welche die Anpassung des Metabolismus erfordern. Die für diese zelluläre Umstrukturierung erforderliche Informationsverarbeitung und -weitergabe wird größtenteils durch Transkriptions-Regulations-Netzwerke gesteuert. Diese setzen sich aus mehreren Transkriptionsinteraktionen zusammen, welche von DNA-bindenden Proteinen (Transkriptionsfaktoren) durch Bindung einer *Target site* des Genoms vorgenommen werden (Babu *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind nicht-kodierende RNAs maßgeblich an der Transkriptionsregulation beteiligt. Ihre Funktionsweise wird auf den nachfolgenden Seiten näher erläutert.

### 1.2.1. Regulatorische RNAs in Prokaryoten

Bakterienzellen bestehen in der Regel zu 20 % aus RNA, bezogen auf ihr Trockengewicht (Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2011). Dabei besitzen Bakterien neben den kodierenden mRNAs und den nicht-kodierenden RNA-Spezies (rRNA, tRNA, tmRNA) eine Vielzahl an kleinen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen mit regulatorischen Aufgaben. Kleine RNA-Regulatoren (*small* RNAs, sRNAs) weisen eine Sequenzlänge von 30 – 500 Nukleotide (nt) auf (Übersicht in Beisel & Storz (2010)). Sie wurden in den letzten 20 Jahren in einer Vielzahl von Bakterienarten identifiziert und ihre Bedeutung für das

regulatorische Netzwerk der Zelle analysiert. Als erste bakterielle sRNA wurde die 6S RNA aus *Escherichia coli* (*E. coli*) von Hindley (1967) beschrieben (Abschnitt 1.3).

Die zentrale Rolle von sRNAs in der posttranskriptionellen Genregulation wird meist durch genomweite Analysen untersucht. Bakterielle sRNAs sind funktionell sehr vielseitige Regulatoren die in drei Klassen unterteilt werden (Klassen I und II sind in Abbildung 1.2 dargestellt): Die erste Klasse beinhaltet sRNAs, die durch *Base-pairing* mit ihrer Ziel-mRNA die Translation ihres Zielproteins inhibieren. Diese Gruppe wird unterteilt in (i) *cis*-kodierte antisense RNAs (asRNAs), welche vom komplementären DNA-Strang der durch sie regulierten mRNA synthetisiert werden und (ii) *trans*-kodierte sRNAs, welche von einem anderen Bereich im Genom synthetisiert werden. Die zweite Klasse bakterieller sRNAs bindet ein spezifisches Zielprotein und verändert dadurch dessen Aktivität (Übersicht in Lalaouna *et al.* (2013)). Die dritte Klasse kleiner regulatorischer RNAs gehört zum CRISPR/Cas-Mechanismus (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) und kann durch Interaktion mit fremder DNA deren Abbau bewirken (Sonnleitner *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wird im Folgenden die Abkürzung sRNA ausschließlich für *trans*-kodierte RNAs verwendet.



**Abbildung 1.2. Regulatorische RNAs und ihre Wirkmechanismen in Prokaryoten (Brantl, 2008).** Unterschieden wird zwischen sRNAs die *cis*- oder *trans*-kodiert sind und über RNA-RNA-Interaktionen wirken und sRNAs die über Protein-Interaktionen die Transkription oder Translation regulieren. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlages.

#### Base-pairing sRNAs:

*Cis*-kodierte *antisense* RNAs (asRNAs) sind auf dem Gegenstrang des Gens ihrer Ziel-RNA kodiert. Die Nukleotidsequenzen von asRNAs sind entweder vollständig komplementär zu ihrer Ziel-RNA oder überlappen am 5'- oder 3'-Ende. Die Sequenzlänge von asRNAs variiert stark: es sind sowohl kurze asRNAs mit einer Länge von 50 – 350 nt als auch lange asRNAs mit bis zu 7.000 nt (*Prochlorococcus* sp. MED4) bekannt (Stazic *et al.*, 2011). AsRNAs können chromosomal- oder extrachromosomal-kodiert sein, wobei extrachromosomal-kodierte asRNAs auf Plasmiden, Bakteriophagen und Transposons vorkommen. So vielseitig wie ihre Lokalisation ist auch ihre regulatorische Funktion auf den Stoffwechsel, die Stressantwort und die Toxinbildung (Übersicht in Brantl (2008), Wagner & Simons

(1994) und Georg & Hess (2011)). Die Interaktion der asRNA mit ihrer Ziel-RNA verändert die Sekundärstruktur beider RNA-Moleküle und führt zur Bildung einer doppelsträngigen RNA-Duplex-Formation. In einigen Fällen hat dies die Veränderung der Stabilität und den Abbau der Ziel-RNA und der asRNA zur Folge. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die asRNA OOP des  $\lambda$ -Bakteriophagen (Krinke *et al.*, 1991). Die Interaktion von asRNA und mRNA muss jedoch nicht zwingend den Abbau beider RNAs bedeuten, sondern kann durch Generierung einer Prozessierungsseite der mRNA deren Translation beeinflussen, wie dies für die asRNA GadY aus *E. coli* beschrieben ist (Opdyke *et al.*, 2004). Neben der posttranskriptionellen Regulation sind außerdem asRNA-vermittelte Mechanismen bekannt, die direkt die Transkription der Ziel-RNA beeinflussen (Giangrossi *et al.*, 2010).

*Trans*-kodierte sRNAs sind in gewissem Abstand zu ihrer Ziel-mRNA kodiert und fungieren meist als negative Regulatoren der Translation (Übersicht in Gottesman & Storz (2011) und Sonnleitner *et al.* (2012)). Durch *Base-pairing* der sRNA an die Ribosomenbindestelle (RBS) wird die Bindung von Ribosomen an ihre Ziel-mRNA verhindert (Darfeuille *et al.*, 2007). Für einige sRNAs wurde außerdem beschrieben, dass durch *Base-pairing* der sRNA in einer Entfernung von mehr als 50 nt von der RBS eine inhibierende Regulation der Translation stattfindet (Sharma *et al.*, 2007). Dies hat einen schnellen Abbau der Ziel-mRNA zur Folge. Weitere Mechanismen der negativen Translationsregulation wirken durch *Base-pairing* der sRNA *downstream* von der Shine-Dalgarno Sequenz, wobei die RBS nicht blockiert wird, jedoch der Abbau der Ziel-mRNA durch RNase E beschleunigt wird (Pfeiffer *et al.*, 2009). *Trans*-kodierte sRNAs können neben der reprimierenden auch eine aktivierende Wirkung auf die Translation haben. Dabei löst das *Base-pairing* der sRNA eine Strukturänderung der Ziel-mRNA aus, wobei die RBS freigelegt und die Translation aktiviert wird (Morfeldt *et al.*, 1995; Urban & Vogel, 2008). Die meisten enterobakteriellen *trans*-kodierten sRNAs benötigen zur Aktivierung ihrer regulatorischen Funktion die Bindung mit dem abundanten Chaperon Hfq. Hfq ist hexamerisch aufgebaut und verfügt über zwei RNA-Bindestellen an die zeitgleich eine sRNA und ihre Ziel-mRNA binden. Dabei wird die distale Bindestelle meist von der sRNA und die proximale Bindestelle von ein oder mehreren Ziel-mRNAs gebunden (Übersicht in Wagner (2013) und in Wagner & Romby (2015)). Die Assoziation mit Hfq erfüllt verschiedene Funktionen innerhalb der sRNA-vermittelten Regulation, u. a. Stabilisierung der sRNA, Beschleunigung der sRNA-mRNA Bindung sowie Entfalten bestimmter RNA-Regionen (Sauer, 2013). Darüber hinaus wurde eine durch Hfq vermittelte Rekrutierung von RNase E zu ihrer Ziel-mRNA beschrieben (Wagner & Romby, 2015). Für *E. coli* und *Salmonella* wurde gezeigt, dass Hfq an eine große Anzahl sRNAs, asRNAs, mRNAs und abundanter RNAs bindet. Darüber hinaus führt die Deletion von *hfq* in Eubakterien häufig zu pleiotropen Phänotypen, wie Beeinträchtigungen des Wachstums, Virulenzverlust und verminderter Stressantwort (Kakoschke *et al.*, 2014; Sittka *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht, dass Hfq eine sehr zentrale Rolle in der sRNA-vermittelten Regulation und somit innerhalb des globalen post-transkriptionellen Netzwerks einnimmt (Vogel & Luisi, 2011; Wagner & Romby, 2015).

Neben den nicht-kodierenden sRNAs werden auch *Riboswitches*, regulatorische Elemente proteinkodierender mRNAs, zu den *Base-pairing* sRNAs gezählt. *Riboswitches* sind Ribo-Regulatoren,

die in den 5'-UTRs der regulierten mRNA lokalisiert sind und aus einer hoch strukturierten Aptamer-Region und einer Expressionsplattform bestehen. Die Aptamer-Region wird durch einen metabolischen Liganden erkannt und gebunden (Lalaouna *et al.*, 2013). Bekannte Liganden sind u. a. S-Adenosylmethionin (SAM), Lysine, Glycine, Thioaminpyrophosphat (TPP), Flavinmononukleotid (FMN) und Adenosyl-cobalamin/Coenzym B12 (AdoCbl) (Breaker, 2012). Die Bindung des jeweils spezifischen Liganden induziert die Konformationsänderung der Expressionsplattform und führt dadurch zur Expressionsregulation des *downstream* gelegenen Transkripts. Die alternativen Sekundärstrukturen bestehen typischerweise aus *Hairpin*-Strukturen, die zum einen Transkriptionsterminatoren bilden oder unterbrechen können, oder zum anderen RBS verdecken oder freilegen können (Übersicht in Waters & Storz (2009)). *Riboswitches* beeinflussen die Transkriptionselongation, die Translationsinitiation sowie das *Splicing* und regulieren somit auf verschiedenen Ebenen der Genexpression.

Eine weitere Gruppe nicht-kodierender, regulatorischer RNAs stellen RNA-Thermometer dar. RNA-Thermometer sind temperatursensitive Sequenzen innerhalb der 5'-Region von mRNAs, die bei niedrigen Temperaturen alternative Sekundärstrukturen ausbilden. Die dadurch hervorgerufene Blockade der RBS führt zur Regulierung der Initiation der Translation. Bei einem Temperaturanstieg verändert sich die Sekundärstruktur stufenweise von einer geschlossenen zu einer offenen Konformation, wobei die Effizienz der Translationsinitiation erhöht wird. Zusätzlich ist für *E. coli* ein RNA-*Thermoswitch* beschrieben, der die Kälteschock-Stressantwort reguliert (Übersicht in Kortmann & Narberhaus (2012)).

#### Protein-bindende sRNAs:

Protein-bindende sRNAs können im Hinblick auf ihre Funktion in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe Protein-bindender sRNAs ist essenziell für eine spezifische RNA-Protein-Bindung und sorgt für die benötigte intrinsische katalytische Aktivität. Zu den durch sRNAs regulierten Proteinen zählen verschiedene RNasen, wie die RNase P (Kazantsev & Pace, 2006). Die zweite Protein-bindende sRNA-Gruppe besteht aus sRNAs, die mit RNA-bindenden Proteinen interagieren und dadurch deren Aktivität regulieren. Dabei regulieren sie die Sequestrierung RNA-bindender Proteine von ihrer ursprünglichen Zielsequenz. Dies erfolgt meist durch Mimikry der Zielsequenz, wobei die sRNA die Proteinkodierungssequenz des Zielproteins enthält, wie es für die sRNA CsrB aus *E. coli* beschrieben ist (Übersicht in Babitzke & Romeo (2007)). Neben den in vielen Bakterien verbreiteten CsrB-ähnlichen sRNAs gibt es außerdem sRNAs, die in der Lage sind, enzymatisch-aktive Proteine zu binden und deren Aktivität zu inhibieren oder zu aktivieren. Das am besten untersuchte und beschriebene Beispiel dafür stellt die 6S RNA dar, welche durch Mimikry eines DNA-Initiationskomplexes einen Komplex mit der RNA Polymerase ( $\sigma^{70}$ -RNA Polymerase) bildet und grundlegend die Transkription reguliert. Eine ausführliche Beschreibung der Regulation durch 6S RNA ist in Abschnitt 1.3 aufgeführt.

### DNA- und Protein-bindende RNAs / crRNAs:

Bakterien haben diverse Verteidigungsstrategien gegen virale Angriffe aus ihrer Umwelt entwickelt. Unter ihnen bildet der CRISPR/Cas-Mechanismus die am besten angepasste Abwehrstrategie gegen fremde DNA-Bestandteile. DNA-bindende RNAs sind Teil dieses Abwehrmechanismus, der in zwei Phasen eingeteilt werden kann. In der ersten Phase ('Aquisitionsphase') werden nach der Virusinfektion Sequenzen des viralen Genoms in die CRISPR-DNA als *Spacer* eingebaut. Die zweite Phase, in der der Abwehrmechanismus umgesetzt wird, kann wiederum in zwei Schritte unterteilt werden. An erster Stelle ('Expressionsphase') wird die von der CRISPR-DNA transkribierte precursor CRISPR RNA (pre-cr RNA) in kurze crRNAs prozessiert, die jeweils eine *Spacer*-Sequenz enthalten. Ein Teil der *Spacer*-Sequenzen ist komplementär zur viralen Ziel-DNA und wird von dieser erkannt. Eine Komplexbildung der crRNA mit der Ziel-DNA sowie mit den Cas-Proteinen entsteht. An zweiter Stelle ('Interferenzphase') wird die virale Ziel-DNA auf beiden DNA-Strängen von den Cas-Proteinen geschnitten. Der Doppelstrangbruch in der viralen Ziel-DNA führt zum *Silencing* der fremden Gensequenz (Übersicht in Doudna & Charpentier (2014); Marraffini (2015); Sonnleitner *et al.* (2012)). Mittlerweile sind insgesamt drei CRISPR/Cas-Systeme (Typ I, II und III) beschrieben, die verschiedene molekulare Mechanismen zur Erkennung und Schneiden der fremden Ziel-DNA verwenden (Übersicht in Makarova *et al.* (2011) und Rath *et al.* (2015)).

### 1.2.2. Kleine regulatorische RNAs in Cyanobakterien

Cyanobakterien weisen aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Habitate eine große Diversität an Regulationsmechanismen auf, in denen sRNAs und asRNAs ein wesentlicher Bestandteil sind. Ca. 65 % der nicht-proteinkodierenden Transkripte in *Synechocystis* sind regulatorische sRNAs und asRNAs, wobei 87 % des gesamten Genoms Proteine kodiert (Übersicht in Georg & Hess (2012)). In den letzten Jahren wurden anhand umfangreicher Transkriptomanalysen hunderte sRNAs und asRNAs in *Synechocystis* (Billis *et al.*, 2014; Kopf *et al.*, 2014; Mitschke *et al.*, 2011a) und weiteren Cyanobakterienspezies identifiziert (Übersichtsartikel: Georg & Hess (2011) und Kopf & Hess (2015)).

Im Folgenden werden zwei kleine regulatorische RNAs aus *Synechocystis* beschrieben, deren funktionelle Eigenschaften bereits umfassend untersucht wurden. Das erste Beispiel bildet das sense/antisense Paar *isiA*/IsrR. Die mRNA des Eisenstress-induzierten Proteins A (*iron stress-induced protein A*, IsiA) wird von der konstitutiv exprimierten asRNA IsrR negativ reguliert (Berghoff & Klug, 2012; Dühring *et al.*, 2006). In der Anfangsphase von Eisenmangel, oxidativem Stress oder Lichtstress kommt es zum Abbruch der Transkription von *isiA* durch den Transkriptionsfaktor Fur. Das unvollständige *isiA*-Transkript wird anschließend von dem antisense Regulator IsrR gebunden und abgebaut. Übersteigt die Stressphase ein gewisses zeitliches Limit, so kommt es zu einer Zunahme des *isiA*-mRNA-Levels, bis dieses das IsrR-Level übersteigt. Infolgedessen wird die reprimierende Wirkung von IsrR auf die *isiA*-Transkription beendet und IsiA wird synthetisiert. Die durch IsrR vermittelte Verzögerung der *isiA*-Transkription ermöglicht eine zeitlich regulierte Expression verschiedener Eisenstressproteine (Legewie *et al.*, 2008). Zudem konnte von Ma *et al.* (2017) die Bildung von IsiA-

Photosystem I-Komplexen während längeren Eisenmangelphasen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass dynamische Änderungen der IsiA-Aggregate die Photosysteme vor übermäßiger Lichtabsorption schützen und somit die Anpassung an Eisenmangelbedingungen begünstigen.

Ein weiteres Beispiel bildet die *trans*-kodierte sRNA PsrR1, welche durch die Regulation mehrerer mRNAs Einfluss nimmt auf die oxygene Photosynthese (Übersicht in Kopf & Hess (2015)). Daten aus Pyrosequenzierung und *Microarray*-Analysen zeigten, dass PsrR1 (früher: SyR1) unter hohen Lichtintensitäten hochreguliert wird, während sie nach Überführung der Zellen in Dunkelheit schnell wieder abgebaut wird (Georg *et al.*, 2009; Mitschke *et al.*, 2011a). Entsprechend konnte bei Zellen unter Tag-Nacht-Bedingungen eine Expressionszunahme von PsrR1 am frühen Morgen beobachtet werden (Beck *et al.*, 2014). Physiologische Analysen zeigten, dass die Überexpression von PsrR1 zu einem *Bleaching*-Phänotyp unter Standardwachstumsbedingungen führt (Mitschke *et al.*, 2011a). Diese Beobachtungen wurden von Daten gestärkt, die durch eine *Microarray*-Analyse des PsrR1-Überexpressionsstammes und einer computerbasierten Vorhersage gewonnen wurden. Demzufolge sind Transkriptionslevel von 16 verschiedenen mRNAs durch PsrR1 reguliert. Unter ihnen befinden sich mehrere Vertreter der Photosynthese zugehörigen Transkripte (u. a. *psaL*, *psaJ*, *chlN*, *psbB* und *cpcA*). Für die mRNA des *psaL*-Gens wurde konkret gezeigt, dass PsrR1 zum einen durch Bindung an die RBS der Ziel-mRNA die Initiation der Translation verhindert. Zum anderen hat die Bindung eine Konformationsänderung der mRNA zur Folge, welche einen Endonuklease-vermittelten Abbau einleitet. Demnach übernimmt PsrR1 als post-transkriptioneller Repressor eine wichtige Funktion in der Regulierung photosynthetischer Genexpression (Georg *et al.* (2014) und Übersichtsartikel (Kopf & Hess, 2015)).

Entgegen der bedeutenden Funktion von Hfq für die Aktivierung der regulatorischen Funktionsweise *trans*-kodierter sRNAs in Prokaryoten, konnte für Cyanobakterien bisher keine Bindung von Hfq an sRNAs nachgewiesen werden (Übersichtsartikel Hess *et al.* (2014) sowie Wilde & Hihara (2016)). Obwohl die Hexamerstruktur von Hfq in Cyanobakterien Hfq-Homologen aus anderen Bakterienspezies stark ähnelt, sind die für die RNA-Bindung entscheidenden Aminosäurereste am proximalen und distalen Ende nicht konserviert (Bøggild *et al.*, 2009). Für *Synechocystis* konnte hingegen mit dem Nachweis der Bindung von Hfq an Pilb1, der ATPase des Typ IV Piliproteins, eine neue Funktion von Hfq aufgedeckt werden (Schuergers *et al.*, 2014). Ein Knockout von Hfq hat in *Synechocystis* den Verlust der Typ IV Piliproteine und in diesem Zusammenhang den Verlust der Motilität sowie der natürlichen Kompetenz zur Folge (Dienst *et al.*, 2008).

### 1.3. 6S RNA

Im Fokus dieser Arbeit steht die Untersuchung der Funktionsweise der regulatorischen 6S RNA in Cyanobakterien. Die 6S RNA ist ein ubiquitärer und hoch abundanter Vertreter der sRNAs und ist in einem breiten Spektrum diverser prokaryotischer Gruppen zu finden. Durch Interaktion mit der RNA Polymerase (RNAP) und den Sigmafaktoren erfüllt sie dabei in der Regel Funktionen der Transkriptionsregulation. Die Namensgebung der 6S RNA leitet sich von dem

Sedimentationskoeffizienten (*Svedberg unit*) der sRNA ab (Brownlee, 1971; Fadouloglou *et al.*, 2015; Goldstein & Harewood, 1969).

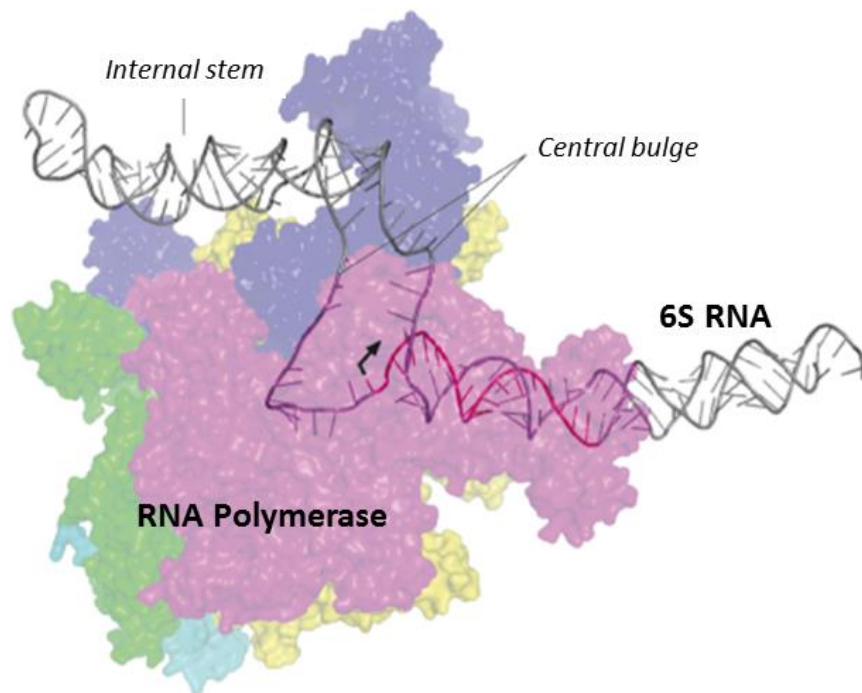
### 1.3.1 Struktur und Funktion in Prokaryoten

Die 6S RNA aus *E. coli* wurde erstmals im Jahr 1967 beschrieben (Hindley, 1967). Wenig später wurde sie als erste nicht-kodierende RNA sequenziert (Brownlee, 1971). Ihre Funktionsweise blieb jedoch fast 30 Jahre lang unbekannt, bis von Wassarman & Storz (2000) gezeigt wurde, dass die RNA in *E. coli* durch Interaktion mit der RNAP die Transkription beeinflusst. Mittlerweile wurde die 6S RNA in weiteren  $\gamma$ -Proteobakterien (u. a. *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica*) identifiziert (Faucher *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2012; Vogel *et al.*, 1987). Ein Überblick über alle prokaryotischen 6S RNAs, zu denen bereits experimentelle Untersuchungen veröffentlicht wurden, ist in Burenina *et al.* (2015) gegeben. Zudem zeigt eine bioinformatische Studie bakterieller Genome, dass in fast allen Phyla der Bakterien potentielle 6S RN-Gene vorhanden sind (Wehner *et al.*, 2014). Neben den  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakterien weisen außerdem Vertreter der Cyanobakterien, Firmicuten, Aquificae, Actinobacteria und Chloroflexi 6S RNA-Homologe auf (Barrick *et al.*, 2005; Burenina *et al.*, 2015; Kondo *et al.*, 2013). Für die Suche nach 6S RNA-Homologen wurden hauptsächlich die Sekundärstrukturen miteinander verglichen, da die Sequenzen kaum konserviert sind. Die spezifische Sekundärstruktur ist essentiell für die Funktion der 6S RNA (Wehner *et al.*, 2014). Inzwischen wurde die Struktur und Funktionsweise der 6S RNA für einige der oben genannten Vertreter detailliert beschrieben (Übersichtsartikel: Cavanagh & Wassarman (2014), Steuten *et al.* (2014b) und Burenina *et al.* (2015)).

Die weitreichendsten Untersuchungen zu Struktur und Regulationsmechanismus wurden für die 6S RNA des Modellorganismus *E. coli* vorgenommen und veröffentlicht. Sie werden im Folgenden näher erläutert: Die in *E. coli* 184 nt lange RNA zeichnet sich durch eine spezifische Sekundärstruktur aus, welche essentiell ist für die Bindung an die RNAP. Diese Sekundärstruktur ist in vielen Bakterienarten hoch konserviert (Barrick *et al.*, 2005; Shephard *et al.*, 2010; Trotochaud & Wassarman, 2005). Sie besteht aus einer meist doppelsträngigen *Hairpin*-Struktur mit einer zentralen, internen Blase (*central bulge*). Die doppelsträngigen Bereiche (*internal stem* und *closing stem*) sind von einigen kleineren *Loops* unterbrochen (Vogel *et al.*, 1987). Diese Struktur ähnelt stark der DNA-Konformation während der Transkriptionsinitiation (*open complex*), weshalb auch von einer DNA-Promotor-Mimikry gesprochen wird (Barrick *et al.*, 2005; Trotochaud & Wassarman, 2005; Wassarman, 2002). Während der Bindung ist die zentrale Blase der 6S RNA direkt am aktiven Zentrum der RNAP positioniert. *Cross-linking*-Studien zeigten zudem, dass die 6S RNA im Komplex mit der RNAP direkten Kontakt zu den  $\beta/\beta'$ -Untereinheiten und der  $\sigma^{70}$ -Untereinheit hat (Cavanagh & Wassarman, 2014; Gildehaus *et al.*, 2007). Steuten *et al.* (2013) haben mittels einer *Mapping*-Analyse ein dreidimensionales Strukturmodell des 6S RNA-RNAP-Komplexes generiert, welches zeigt, dass sich mehrere Regionen der  $\sigma^{70}$ -Untereinheit in nächster Nähe zur 6S RNA befinden. Ein abgeleitetes Strukturmodell wurde in Steuten *et al.* (2014b) veröffentlicht und ist in Abbildung 1.3 in leicht abgeänderter Form gezeigt. Eine entscheidende Rolle für die 6S RNA-RNAP-Komplexbildung übernimmt die Region 4.2 der  $\sigma^{70}$ -



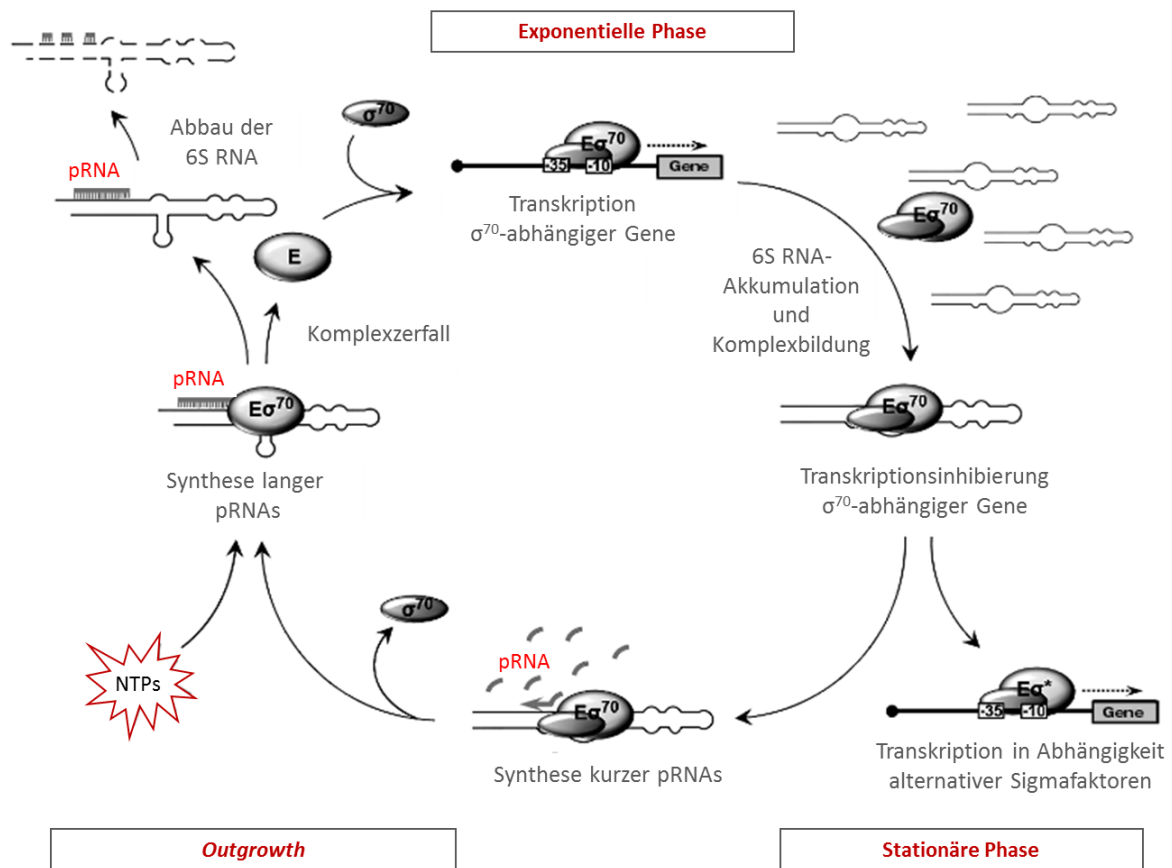
Untereinheit, welche mit der *Hairpin*-Struktur der 6S RNA interagiert (Cavanagh *et al.*, 2008; Klocko & Wassarman, 2009; Steuten *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.3.** Dreidimensionales Strukturmodell eines RNA-Protein-Komplexes in *E. coli* bestehend aus 6S RNA und  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzym. Die Sekundärstruktur der 6S RNA ist in grau, bzw. die pRNA-Template-Region in pink dargestellt. Der schwarze Pfeil deutet Transkriptionsstart und -richtung der pRNA-Synthese an. Die Untereinheiten der RNAP sind farblich voneinander abgehoben:  $\sigma^{70}$  in blau;  $\beta$  in magenta;  $\beta'$  in gelb;  $\alpha$  I in grün;  $\alpha$  II in cyan. Verändert nach Steuten *et al.* (2014b).

Neben der konservierten Sekundärstruktur ist ihre enorme Stabilität unter Standardwachstumsbedingungen sowie unter Stressbedingungen charakteristisch für die 6S RNA (Lee *et al.*, 1978). Zudem weist sie eine äußerst hohe Abundanz auf: In *E. coli* akkumuliert sie während des zellulären Wachstums von  $\sim 1.000$  Kopien pro Zelle in der exponentiellen Phase zu  $\sim 10.000$  Kopien pro Zelle in der frühen stationären Phase (Wassarman & Storz, 2000). *In vivo*- und *in vitro*-Experimente zeigten, dass die 6S RNA während der stationären Phase einen Komplex mit dem RNAP-Holoenzym bildet. Dabei bindet sie mit hoher Affinität an das  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzym (Gildehaus *et al.*, 2007) und verhindert dadurch die Bindung von Promotor-DNA an die RNAP (Wassarman & Saecker, 2006). *In vitro*-Experimente ergaben außerdem, dass es auch zu einer schwachen und instabilen Komplexbildung von 6S RNA und  $\sigma^{38}$ -RNAP-Holoenzymen kommen kann (Gildehaus *et al.*, 2007; Trotochaud & Wassarman, 2005). Für die Promotorspezifität der 6S RNA ist eine schwache oder auch fehlende -35- sowie eine verlängerte -10-Region ausschlaggebend (Cavanagh *et al.*, 2008; Trotochaud & Wassarman, 2004). Jedoch wurden bei weiteren Untersuchungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mehrere Promotoren gefunden, die von dieser Regel abweichen (Cavanagh *et al.*, 2008; Gildehaus *et al.*, 2007; Kim & Lee, 2004; Neusser *et al.*, 2010).

Neben der Fähigkeit der Komplexbildung mit der RNAP besitzt die 6S RNA eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft: Sie wird von der RNAP als *Template* für die *de novo* Synthese von kleinen *product* RNAs (pRNA) verwendet (Gildehaus *et al.*, 2007; Wassarman & Saecker, 2006). Die RNAP agiert somit als RNA-abhängige RNAP (Steuten *et al.*, 2014a). Die Sequenz des synthetisierten pRNA-Transkripts ist komplementär zur 6S RNA, wobei sich das Startnukleotid (U44) für die pRNA-Synthese innerhalb der internen Blase befindet (Gildehaus *et al.*, 2007). Für *E. coli* konnte zunächst durch *in vitro* Studien (Gildehaus *et al.*, 2007; Wassarman & Saecker, 2006), später auch *in vivo* die Synthese von 10-20 nt langen pRNA-Transkripten nachgewiesen werden (Wassarman & Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010). *In vivo*-Studien zeigten, dass die pRNA-Synthese startet, nachdem die Zellen aus der stationären Phase in frisches Medium überführt wurden und ihnen somit ein verbessertes Nährstoffangebot (*nutritional upshift*) zur Verfügung stand (Wassarman & Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010). Auch *in vitro* generierte Daten demonstrieren eine Abhängigkeit der pRNA-Synthese gegenüber der NTP-Konzentration (Wassarman & Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010). Daher wird angenommen, dass ein durch den *nutritional upshift* hervorgerufener Anstieg der zellulären NTP-Konzentration die pRNA-Synthese beeinflusst (Wassarman & Saecker, 2006). Bei geringer NTP-Konzentration werden sehr kurze pRNA-Transkripte gebildet, die jedoch keinen Komplex mit der 6S RNA bilden (*abortive transcription*). Eine Zunahme der zellulären NTP-Konzentration ermöglicht die Elongation der pRNA-Transkripte. Bei Erreichen einer pRNA-Transkriptlänge von 9 nt wird zunächst die Dissoziation der  $\sigma^{70}$ -Untereinheit vom 6S RNA-RNAP-Komplex ausgelöst und nach Elongation der pRNA um vier weitere Nukleotide folgt die Ablösung des 6S RNA-pRNA-Hybrids von dem RNAP-Coreenzym. Während der pRNA-Synthese kommt es zur Konformationsänderung der 6S RNA-Sekundärstruktur, bei der zwischenzeitlich eine neue *Hairpin*-Struktur ausgebildet wird (Panchapakesan & Unrau, 2012; Steuten & Wagner, 2012). Die pRNA-Synthese übernimmt somit zwei wesentliche regulatorische Funktionen: Erstens kommt es zum 6S RNA-RNAP-Komplexzerfall und zur Freisetzung der RNAP mit der Folge der Transkriptionsinitiation  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren. Die Transkription  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren ist für ein Wiederanwachsen der Zellen (*outgrowth*) aus der stationären Phase erforderlich. Zweitens führt die Bildung von 6S RNA-pRNA-Hybriden zu einer Destabilisierung und Abbau der 6S RNA (Gildehaus *et al.*, 2007; Shephard *et al.*, 2010; Wassarman & Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010). Die für den Abbau von 6S RNA und 6S RNA-pRNA-Hybriden verantwortlichen Enzyme wurden bisher noch nicht beschrieben (Burenina *et al.*, 2015; Steuten *et al.*, 2014b). Das in Abbildung 1.4 dargestellte schematische Modell fasst die einzelnen funktionellen Phasen der 6S RNA-Regulation in *E. coli* zusammen.



**Abbildung 1.4. Schematisches Modell der 6S RNA-Funktionsweise und pRNA-Synthese in *E. coli*.** Das 6S RNA-Level akkumuliert im Laufe des Zellwachstums von der exponentiellen zur früh-stationären Phase und führt zur Komplexbildung von 6S RNA und  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzym ( $E\sigma^{70}$ ). Dies hat die Transkriptionshemmung  $\sigma^{70}$ -abhängiger Gene sowie die Transkriptionsaktivierung durch alternative Sigmafaktoren zur Folge. Nach der 6S RNA-RNAP-Komplexbildung fungiert die 6S RNA als *Template* für die Synthese von pRNAs. Zunächst werden sehr kurze pRNAs synthetisiert, die schnell von dem 6S RNA-RNAP-Komplex dissoziieren und die Dissoziation der  $\sigma^{70}$ -Untereinheit hervorrufen. Ausgelöst durch einen Anstieg des zellulären NTP-Levelns kommt es zur Synthese von längeren pRNA-Transkripten, die ab 9 nt und bei weiterer Elongation zur Konformationsänderung der 6S RNA-Sekundärstruktur führt. Infolgedessen zerfällt der 6S RNA-pRNA-RNAP-Komplex, 6S RNA und pRNA werden abgebaut und  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzyme binden an die entsprechende Promotor-DNA. Mit der Transkription  $\sigma^{70}$ -abhängiger Gene wird das Wiederanwachsen der Zellen aus der stationären Phase initiiert. E: RNAP-Coreenzym. Verändert nach Burenina *et al.* (2015).

Ergebnisse von Transkriptom-Studien mit 6S RNA-defizienten Mutanten zeigten, dass ein großer Anteil der  $\sigma^{70}$ -abhängigen Gene durch die 6S RNA entweder direkt oder indirekt aufgrund von sekundären Effekten aktiviert oder inhibiert wird (Cavanagh *et al.*, 2008; Gildehaus *et al.*, 2007; Trotochaud & Wassarman, 2004). Die Abwesenheit von 6S RNA hat einen Einfluss auf die Expression vieler zentraler Stoffwechselgene. Zudem ist die Transkription von Genen des Translationsapparats, wie z. B. von Genen kodierend für ribosomale Proteine und RNA, Translationsfaktoren und andere zu Beginn der stationären Phase runterreguliert. Insgesamt konnte für  $\sim 250$  Gene in der exponentiellen und für  $\sim 270$  Gene in der stationären Phase eine veränderte Genexpression ermittelt werden (Neusser *et al.*, 2010). Interessanterweise wurden Veränderungen im Expressionslevel nicht nur für  $\sigma^{70}$ -abhängige, sondern auch für  $\sigma^{38}$ -,  $\sigma^{32}$ - und  $\sigma^{24}$ -abhängige Promotoren nachgewiesen. Unter dem Einfluss von

6S RNA kommt es demnach zu einer Hochregulierung der  $\sigma^{38}$ -abhängigen Transkription (Cavanagh *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004; Neusser *et al.*, 2010; Trotochaud & Wassarman, 2004). Da während der spät-stationären Phase fast alle  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzyme durch 6S RNA-Moleküle sequestriert sind, wird ein indirekter Wechsel von  $\sigma^{70}$ -abhängiger Transkription zu  $\sigma^{38}$ -abhängiger Transkription ermöglicht (Gildehaus *et al.* (2007); sowie Übersichtsartikel Steuten *et al.* (2014b), Cavanagh & Wassarman (2014) und Burenina *et al.* (2015)).

Obwohl die Abwesenheit von 6S RNA das Transkriptom der Zellen verändert, sind auf physiologischer Ebene nur geringe Auswirkungen zu ermitteln. Zellen ohne 6S RNA zeigten bei Wachstumsanalysen weder in der exponentiellen Phase noch zu Beginn der stationären Phase ein verändertes Wachstumsverhalten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Lee *et al.*, 1985). Jedoch wiesen 6S RNA-defiziente Zellen einen Überlebensnachteil bei kompetitiven Wachstumsversuchen und unter Langzeitnährstoffmangelbedingungen auf (Trotochaud & Wassarman, 2004). Unter alkalischen Wachstumsbedingungen erreichten 6S RNA-defiziente Zellen eine höhere Zelldichte. Dies ging mit einer verstärkten Synthese des Transkriptionsfaktors PspF einher, welcher die Transkription von Genen aktiviert, die für stressabhängige Proteine kodieren (Trotochaud & Wassarman, 2006). Die Überexpression von 6S RNA führt in  $\sigma^{38}$ -defizienten Zellen zu einer verringerten Lebensfähigkeit in der spät-stationären Phase (Wassarman & Storz, 2000). Da die 6S RNA durch ihre Funktion sowohl direkt als auch indirekt Einfluss nimmt auf die zelluläre, globale Stressantwort bei wechselnden Umweltbedingungen, wird sie auch als wachstumsabhängiger Riboregulator bezeichnet (Steuten *et al.*, 2014b). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen 6S RNA und der Expression von Enzymen die am Purinstoffwechsel beteiligt sind sowie der intrazellulären Konzentration des globalen Regulators der Stressantwort ppGpp nachgewiesen werden (Cavanagh *et al.*, 2010; Neusser *et al.*, 2010).

Die Regulation der 6S RNA-Biogenese ist in *E. coli* hochkomplex: Das 6S RNA-kodierende Gen *ssrS* ist Teil eines bi-cistronischen Operons und wird zusammen mit dem Gen *ygfA*, welches für das Protein 5-Formyltetrahydrofolat Cycloligase kodiert, transkribiert (Hsu *et al.*, 1985; Jeanguenin *et al.*, 2010). Die Transkription wird von zwei Promotoren, P1 ( $\sigma^{70}$ -abhängig) und P2 ( $\sigma^{38}$ - und  $\sigma^{70}$ -abhängig), in Abhängigkeit der Wachstumsphase reguliert. Bei exponentiellem Wachstum wird 6S RNA von P1 mit einer fünffach höheren Transkriptionsrate als von P2 transkribiert. Wohingegen P1 mit Beginn der stationären Wachstumsphase inaktiviert wird und P2 als einziger Promoter die Transkription fortführt (Kim & Lee, 2004). Die Termination erfolgt in Abhängigkeit von Rho, wobei mehrere Rho-abhängige Transkriptions-Terminatorregionen *downstream* der 6S RNA-Sequenz beschrieben wurden (Chae *et al.*, 2011). Ausgehend von den Tandem-Promotoren werden zunächst größere *Precursor*-RNAs transkribiert die anschließend in 6S RNA prozessiert werden (Kim & Lee, 2004). Ein schematischer Überblick über die genomische Anordnung des *ssrS* Gens und den Ablauf der 6S RNA-Synthese ist in Burenina *et al.* (2015) abgebildet. An der Regulation der 6S RNA-Synthese sind mehrere Nukleoid-assoziierte Proteine (NAPs), wie H-NS, LRP, StpA und FIS, beteiligt (Neusser *et al.*, 2010). Neben der Regulation durch externe Transkriptionsfaktoren findet zudem eine Autoregulation der beiden Promotoren in Abhängigkeit der 6S RNA-Akkumulation statt (Lee *et al.*, 2013).

Einige der zuvor beschriebenen Eigenschaften sind auf 6S RNA-Homologe in anderen Bakterien übertragbar. Darüber hinaus sind für einige 6S RNA-Homologe jedoch auch andere physiologische Funktionen bekannt: Neben der Regulation des *Outgrowth* aus der stationären Phase (*E. coli* und *B. subtilis* (6S-1 RNA)), der Anpassung an erhöhte pH-Werte (*E. coli*) und der Terminierung der Sporulation (*B. subtilis* (6S-2 RNA)), beeinflusst die 6S RNA die Toleranz gegenüber oxidativem Stress (*Burgholderia cenocepacia*) sowie die optimale Anpassung des intrazellulären Wachstums in Wirtszellen (*Legionella pneumophila*, *Salmonella Typhimurium*) (Übersichtsartikel: Steuten *et al.* (2014b)). Bei einem Vergleich der 6S RNA-Homologe fallen besonders die Unterschiede der 6S RNA-Expressionsprofile auf (Übersicht in Burenina *et al.* (2015)), welche in Zukunft Aufschluss über die physiologischen Funktionen der 6S RNA-Homologe geben könnten (Wassarman, 2018).

In den meisten Prokaryoten kommt eine 6S RNA Kopie pro Genom vor. Jedoch sind auch Vertreter mit mehreren 6S RNA-Kopien bekannt, die hauptsächlich in die *Bacillus*- und *Clostridium*-Gruppe einzuordnen sind. Zwei verschiedene 6S RNA-Kopien wurden u. a. für *Bacillus subtilis*, *Bacillus halodurans*, *Oceanobactillus iheyensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* und *Legionella pneumophila* beschrieben (Barrick *et al.*, 2005; Weissenmayer *et al.*, 2011). Das Genom von *Clostridium acetobutylicum* enthält sogar drei 6S RNA-Kopien. Das Vorkommen mehrerer 6S RNA-Kopien ist auf frühere Genduplikationen zurückzuführen (Barrick *et al.*, 2005).

In *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) sind die beiden 6S RNA-Kopien als 6S-1 und 6S-2 RNA beschrieben. Die 190 nt lange 6S-1 RNA (*bsrA*) ähnelt mit ihrer charakteristischen Sekundärstruktur strukturell und mit ihrer Akkumulation während der stationären Phase auch funktionell der *E. coli*-6S RNA (Barrick *et al.*, 2005; Beckmann *et al.*, 2011; Trotochaud & Wassarman, 2005). Die Expression der 203 nt langen 6S-2 RNA (*bsrB*) hingegen hat während der frühen exponentiellen Phase ihr Maximum und nimmt bei weiterem Wachstum in Richtung der stationären Phase kontinuierlich ab (Beckmann *et al.*, 2011; Trotochaud & Wassarman, 2005). In von Beckmann *et al.* (2011) durchgeführten *in vitro*-Studien wurde gezeigt, dass sowohl 6S-1 RNA als auch 6S-2 RNA einen Komplex mit  $\sigma^A$ -RNAP bilden und als *Template* für die Synthese von pRNAs fungieren können. Für die 6S-1 RNA konnte in Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, über RNA-Seq-Analysen sowohl sehr kurze synthetisierte pRNAs (8-12 nt) als auch längere pRNA-Transkripte von 13-15 nt und 16-24 nt Länge nachgewiesen werden. Die kurzen pRNA-Transkripte machten dabei den größten Anteil aller pRNA-Transkripte aus (Beckmann *et al.*, 2011). Weitere *in vivo*-Analysen zeigten, dass während des *Outgrowth* aus der stationären Wachstumsphase die Anzahl sowie auch die Länge ( $\geq 14$  nt) der pRNA-Transkripte der 6S-1 RNA zunimmt (Beckmann *et al.*, 2011; Beckmann *et al.*, 2012). Erst durch die Synthese der längeren Transkripte kommt es zur Konformationsänderung der 6S RNA-pRNA-Duplexe und folglich zum 6S RNA-RNAP-Komplexzerfall (Beckmann *et al.*, 2012). Inzwischen wurden auch *in vivo* synthetisierte pRNAs der 6S-2 RNA mit einer Länge von  $\sim 14 - 25$  nt in exponentiell wachsenden Zellen nachgewiesen (Hoch *et al.*, 2016).

### 1.3.2 6S RNA in Cyanobakterien

Im Jahr 1997 wurde als erste cyanobakterielle 6S RNA die 185 nt lange 6Sa RNA aus *Synechococcus* sp. PCC 6301 identifiziert (Watanabe *et al.*). In diesem Zusammenhang wurde auch erstmals die 6Sa RNA aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 erwähnt. Das 6Sa RNA kodierende Gen wurde als *ssaA* (*small stable* RNA, *S*ix *S*a RNA *A*) bezeichnet. Jedoch wurde erst mit dem Vergleich von Genomsequenzen verschiedener Bakterienphyla ein Zusammenhang zu den 6S RNA-Homologen der  $\gamma$ -Proteobakterien hergestellt (Barrick *et al.*, 2005). Anders als der in Abschnitt 1.3.1 beschriebene charakteristische Verlauf der Transkriptakkumulation von 6S RNA in *E. coli* und 6S-1 RNA in *B. subtilis*, nimmt das 6Sa RNA-Transkriptlevel in *Synechococcus* sp. PCC 6301 während des Zellwachstums ab und liegt während der stationären Phase in verringerten Mengen vor (Watanabe *et al.*, 1997).

Im Jahr 2005 wurde in elf verschiedenen Stämmen der maritimen Cyanobakteriengattungen *Prochlorococcus* und *Synechococcus* die sRNA Yfr7 nachgewiesen, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit sowie der übereinstimmenden Position im Genom mit 6Sa RNA aus *Synechococcus* sp. PCC 6301 als 6S RNA-Homolog identifiziert werden konnte (Axmann *et al.*, 2005). In *Prochlorococcus* MED4 existieren zwei 6S RNA-Varianten mit unterschiedlicher Länge die vom selben Genlocus transkribiert werden (Axmann *et al.*, 2007), weshalb sie nicht als zwei unabhängige 6S RNAs einzuordnen sind (Wehner *et al.*, 2014). Für das längere Transkript (332 nt) wurde eine Akkumulation während der spät-exponentiellen bzw. der früh-stationären Phase nachgewiesen. Das kürzere Transkript (220 nt) akkumuliert bei höheren Zelldichten. Das Akkumulationslevel der beiden 6S RNA-Transkripte ändert sich zudem in Abhängigkeit des circadianen Tag-Nacht-Rhythmus, was auf eine 6S RNA-vermittelte Regulation der Adaptation an wechselnde Lichtbedingungen hindeutet (Axmann *et al.*, 2007).

Cyanobakterielle 6S RNA-Gene sind meist *downstream* von *purK* lokalisiert und weisen damit Parallelen zur genomischen Lokalisation des 6S RNA-Gens in anderen Bakterienphyla auf (Axmann *et al.*, 2007; Axmann *et al.*, 2005; Barrick *et al.*, 2005; Rediger *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 1997; Wehner *et al.*, 2014). Ähnlich wie in *E. coli*, wo *ssrS* mit dem für den Purin-Metabolismus wichtigen Gen *ygfA* kotranskribiert wird, kodiert *purK* in Cyanobakterien für die Untereinheit II der Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, welche ebenfalls für den Purin-Metabolismus benötigt wird (Schwarz *et al.*, 1992).

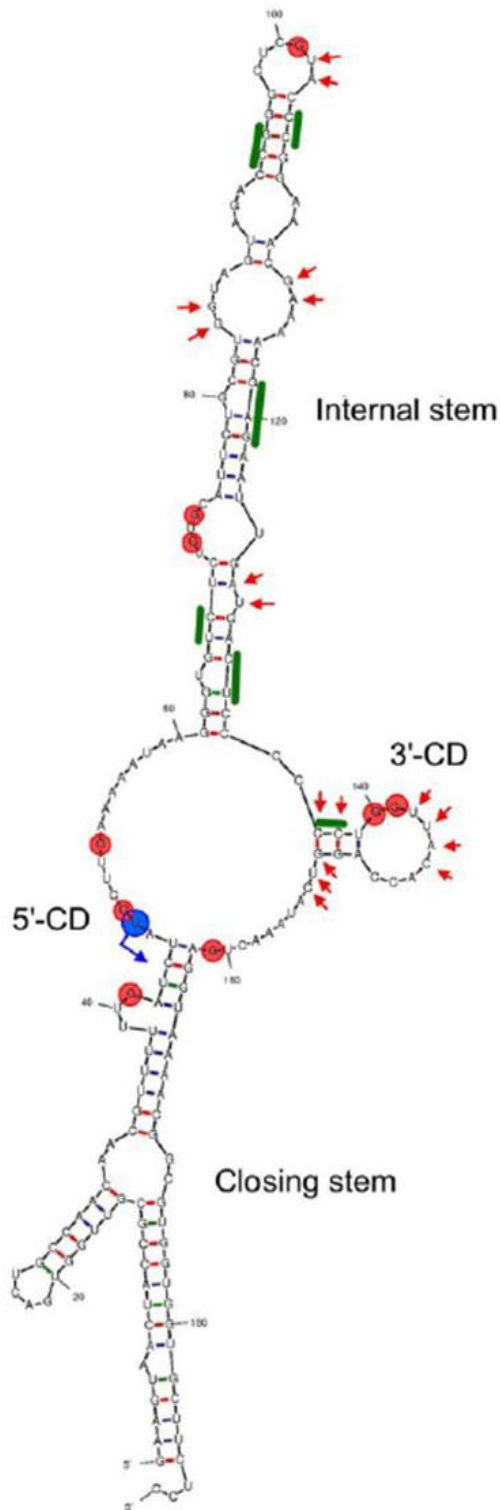
In der Genomdatenbank für Cyanobakterien *CyanoBase* ist das 6S RNA-kodierende Gen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 als *ssaA* annotiert und das ~ 188 nt lange Transkript wird als 6Sa RNA bezeichnet (CyanoBase). Zur Vereinfachung wird im Rahmen dieser Arbeit nachfolgend die Bezeichnung 6S RNA für das Transkript des *ssaA*-Gens in *Synechocystis* verwendet. Diese Regel findet zudem Anwendung auf alle nachfolgend genannten *ssaA*-Transkripte weiterer Cyanobakterien.

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurden von Rediger *et al.* (2012) erste Analysen zur regulatorischen Funktion und Struktur von 6S RNA in Cyanobakterien durchgeführt. Dafür wurden vier entfernt verwandte Cyanobakterien ausgewählt (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Prochlorococcus* MED4 und *Nostoc* PCC 7120) und deren 6S RNA-Sekundärstruktur sowie die 6S RNA-vermittelte Transkriptionsregulation und pRNA-Synthese im Vergleich zu *E. coli* untersucht. Analysen zur thermodynamischen Stabilität der 6S RNA aus allen Cyanobakterien sowie enzymatisches und

chemisches *Probing* der 6S RNAs aus *Synechocystis*, *Synechococcus* und *Nostoc* ergaben eine große Übereinstimmung der Sekundärstruktur mit der *E. coli*-6S RNA. Unter Verwendung dieser Ergebnisse konnten die Autoren mithilfe der Onlineplattform *mfold* (Zuker, 2003) eine Vorhersage für die 6S RNA-Sekundärstruktur in *Synechocystis* erstellen. Das Modell der Sekundärstruktur ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Die Sekundärstruktur weist die für 6S RNA charakteristischen Merkmale auf: eine ausgeprägte einzelsträngige, zentrale Blase, die in diesem Fall in der 3'-*central domain* (3'-CD) von einem doppelsträngigen Element durchbrochen wird sowie die jeweils doppelsträngigen, z. T. diskontinuierlichen Stammregionen (Rediger *et al.*, 2012).

Mithilfe von *in vitro*-Analysen wurden unter Verwendung cyanobakterieller 6S RNA und *E. coli*-RNAP große Homologien im Hinblick auf die regulatorische Funktion der cyanobakteriellen 6S RNA und der *E. coli*-6S RNA nachgewiesen (Rediger *et al.*, 2012). Für drei cyanobakterielle 6S RNAs (*Synechocystis*, *Synechococcus* und *Nostoc*) wurde die Komplexbildung mit der *E. coli*-RNAP, Transkriptionshemmung von *E. coli*-Promotoren, pRNA-Synthese sowie der anschließende 6S RNA-RNAP-Komplexzerfall experimentell gezeigt. *In vitro* synthetisierte pRNAs der *Synechocystis*-6S RNA haben eine Länge von ~ 18 - 30 nt und sind damit etwa 10 nt länger als *in vitro* generierte pRNAs von *E. coli*-6S RNA (Rediger *et al.*, 2012). RNA-Seq-Analysen gaben zudem einen ersten Hinweis auf die Existenz *in vivo* synthetisierter, ~ 30 nt langer pRNAs in *Synechocystis* (Mitschke *et al.*, 2011a). Als Startposition der pRNA-Synthese dient Uracil (U47) im einzelsträngigen 5'-Bereich der zentralen Blase (Abbildung 1.5, und Abbildung 1.6; Mitschke *et al.* (2011a); Rediger *et al.* (2012)).

Ähnlich wie die weiter oben für *Prochlorococcus*-6S RNA beschriebene potentielle Regulierung von Prozessen, die für den Tag-Nacht-Rhythmus entscheidend sind, deuten physiologische Analysen einer *Synechocystis*-6S RNA-Deletionsmutante ebenfalls auf eine 6S RNA-vermittelte Anpassung an Starklichtbedingungen, in diesem Fall auf Festmedium, hin (Rediger *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.5. Sekundärstruktur der 6S RNA aus *Synechocystis* (Rediger *et al.*, 2012).** Strukturvorhersage basierend auf enzymatischen und chemischen Analysen, erstellt mit dem Programm *mfold*. Start und Richtung der pRNA-Synthese sind durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet. Mit roten Kreisen sind mittels RNase T1-Zugänglichkeit nachgewiesene einzelsträngige Guanosine markiert. Doppelsträngige Bereiche, die durch RNase V1 verdaut wurden, sind grün angedeutet. Rote Pfeile weisen auf Nukleotide hin, die durch *In-line probing* gespalten wurden. Die 3'- und 5'-Bereiche der zentralen Blase sind mit 3'-CD und 5'-CD gekennzeichnet. CD: *central domain*



Bei einem direkten Vergleich der 6S RNA-Sequenzen von *E. coli* und vier Cyanobakterien wird deutlich, dass nur wenige Bereiche konserviert sind. Im dem Abschnitt der als *Template* für die pRNA-Synthese dient ist eine Häufung der konservierten Basen zu erkennen (Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6.** Alignment der 6S RNA-Sequenzen von vier Cyanobakterien (*Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Nostoc* PCC 7120, *Synechocystis* PCC 6803 und *Prochlorococcus* MED4) im Vergleich zur 6S RNA-Sequenz von *E. coli*. Das Alignment wurde von Rediger *et al.* (2012) mit dem Online Dienst CLUSTAL W erstellt. Weiße Schrift auf schwarzem Hintergrund: 100 % konserviert; weiße Schrift auf blau-grünem Hintergrund: 80 % konserviert. Der blaue Pfeil markiert das jeweilige Startnukleotid sowie die Richtung der pRNA-Synthese. Bereiche der Sekundärstruktur von *Synechocystis* (schwarzer Pfeil) sind durch farbige Linien oberhalb der Sequenzen markiert: *closing stem* (grün); *central bubble* (rot); *internal stem*, *internal loop* (orange), vgl. Abbildung 1.5. Verändert nach Rediger *et al.* (2012).

### 1.3.3 6S RNA Homologe in Eukaryoten

Auch in Eukaryoten kommen sRNAs vor, die funktionelle Homologien zu bakteriellen 6S RNAs aufweisen. Die in Mäusen vorkommenden abundanten B1 und B2 RNAs sowie die humane Alu RNA werden unter Stressbedingungen, wie Hitzeschock, von der RNAP III transkribiert. Daraufhin binden sie an einen Präinitiationskomplex, bestehend aus RNAP II und DNA, und reprimieren infolgedessen die Transkription RNAP II-abhängiger Promotoren (Walters *et al.*, 2009; Yakovchuk *et al.*, 2009). Dabei ist jedoch nur B2 RNA in der Lage, die Aktivität der RNAP II zu inhibieren. Für B1 RNA konnte zwar eine Komplexbildung, jedoch keine Transkriptionsinhibierung nachgewiesen werden (Wagner *et al.*, 2010). Eine weitere funktionelle Unterscheidung zu bakterieller 6S RNA zeigt sich dadurch, dass B2 RNA nicht als *Template* für pRNAs, sondern für ein 18 nt langes Transkript dient, welches am 3'-Ende durch Synthese verlängert wird. Die Transkriptelongation wird von der RNA-abhängigen RNA Polymerase II-Aktivität katalysiert und hat eine Destabilisierung des B2 RNA-RNAP II-Komplexes zur Folge (Bernecky & Cramer, 2013; Wagner *et al.*, 2013).

### 1.4. Sigmafaktoren in Prokaryoten

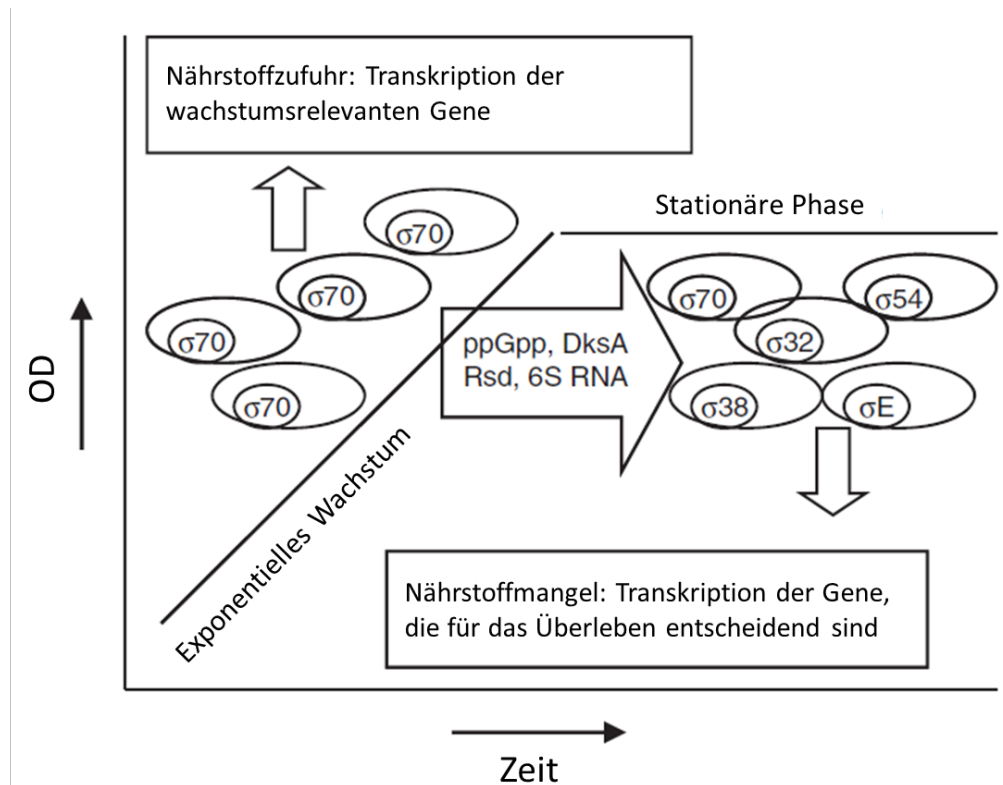
Das Holoenzym der RNAP setzt sich in Prokaryoten aus sechs Untereinheiten zusammen (2x  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$ ,  $\sigma$ ). Das RNAP-Coreenzym, bestehend aus den Untereinheiten 2x  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\omega$ , ist üblicherweise an die DNA assoziiert. Für die Promotorerkennung sowie die Transkriptionsinitiation ist jedoch die reversible Bindung eines Sigmafaktors ( $\sigma$ ) an das RNAP-Coreenzym notwendig (Travers & Burgess,

1969). Der gebundene Sigmafaktor vermittelt die spezifische Bindung der RNAP an die -10- und -35-Region der Promotor-DNA. Die in Prokaryoten vorkommenden Sigmafaktoren werden aufgrund von Unterschieden in ihrer Sequenz und Funktion in zwei Gruppen unterteilt:  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^{54}$  (Helmann & Chamberlin, 1988; Wösten, 1998).

*E. coli* synthetisiert neben dem Standard-Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  ( $\sigma^D$ ), welcher für die Expression essentieller Haushaltsgene entscheidend ist, noch sechs alternative Sigmafaktoren ( $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ),  $\sigma^{38}$  ( $\sigma^S$ ),  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ ),  $\sigma^{28}$  ( $\sigma^F$ ),  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ ) und  $\sigma^{FecI}$ ) (Wösten, 1998). Die alternativen Sigmafaktoren regulieren die Transkription von Genen die für die Stressantwort bei wechselnden Umweltbedingungen sowie für die Anpassung und das Überleben in der stationären Phase entscheidend sind. Sie sind jedoch im Gegensatz zu  $\sigma^{70}$  meist nicht essentiell für die Überlebensfähigkeit der Zelle unter Standardwachstumsbedingungen (Übersicht in Sharma & Chatterji (2010)). Da die Anzahl der RNAP-Coreenzyme in der Zelle unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nahezu konstant bleibt, beeinflusst das intrazelluläre Level der einzelnen Sigmafaktoren die Komplexbildung mit dem RNAP-Coreenzym (Grigorova *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2009). Während sich die Konzentration von  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$  und  $\sigma^{28}$  über die verschiedenen Wachstumsphasen ebenfalls kaum verändert, variiert das Level einzelner alternativer Sigmafaktoren in Abhängigkeit des jeweiligen Umwelteinflusses (Jishage *et al.*, 1996; Piper *et al.*, 2009). Neben der Quantität der Sigmafaktoren ist die Affinität, mit der Sigmafaktoren an die RNAP assoziieren, entscheidend für die Bildung des RNAP-Holoenzym. *In vitro*-Bindestudien ergaben für  $\sigma^{70}$  die höchste und für  $\sigma^{38}$  die niedrigste Affinität (Maeda *et al.*, 2000).

Der Wechsel von exponentiellem Wachstum hin zur stationären Phase geht mit der Anpassung der Genexpression einher. Während des Umschaltens der Transkription von  $\sigma^{70}$ -abhängigen Genen hin zu Stress-relevanten Genen übernehmen die Effektoren (p)ppGpp, DksA und 6S RNA regulatorische Funktionen (Abbildung 1.7). Durch ihre spezifische Bindung an die RNAP ist die Bindung an die Promotor-DNA von  $\sigma^{70}$ -abhängigen Genen inhibiert, gleichzeitig wird die Transkription von  $\sigma^{38}$ -abhängigen Genen, die für das Überleben der Zelle unter Nährstoffmangel essentiell sind, aktiviert. Eine Übersicht der regulatorischen Funktionen von (p)ppGpp und DksA ist in Sharma & Chatterji (2010) beschrieben. Die regulatorische Funktion von 6S RNA wird in Abschnitt 1.3 ausführlich erläutert.

Neben (p)ppGpp, DksA und 6S RNA beeinflussen Anti-Sigmafaktoren die Transkription, indem sie an den jeweils artverwandten Sigmafaktor binden und die Transkriptionsinitiation inhibieren (Übersichtsartikel Hughes & Mathee (1998)). Ein wichtiges Beispiel dafür ist der Anti-Sigmafaktor Rsd in *E. coli*, der während der stationären Phase an  $\sigma^{70}$  bindet und dadurch die Transkription  $\sigma^{70}$ -abhängiger Gene inhibiert und die von alternativen Sigmafaktoren vermittelte Transkription fördert (Hofmann *et al.*, 2011; Jishage *et al.*, 1996; Piper *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation in *E. coli* während des Wechsels von exponentiellem Wachstum zur stationären Phase.** Umschalten der Transkription von wachstumsrelevanten Genen hin zu Genen, die für das Überleben unter Stressbedingungen relevant sind. Bei ausreichendem Nährstoffvorkommen wird die Transkriptionsaktivität überwiegend von  $\sigma^{70}$  gesteuert, während unter Nährstoffmangel alternative Sigmafaktoren ganz wesentlich die Transkription bestimmen. Reguliert wird dieser Wechsel durch die Effektoren (p)ppGpp, DksA, Rsd und 6S RNA. Die dargestellte Anzahl der Moleküle entspricht nicht dem tatsächlichen Vorkommen in der Zelle. Verändert nach Sharma & Chatterji (2010).

#### 1.4.1 Sigmafaktoren in *Synechocystis*

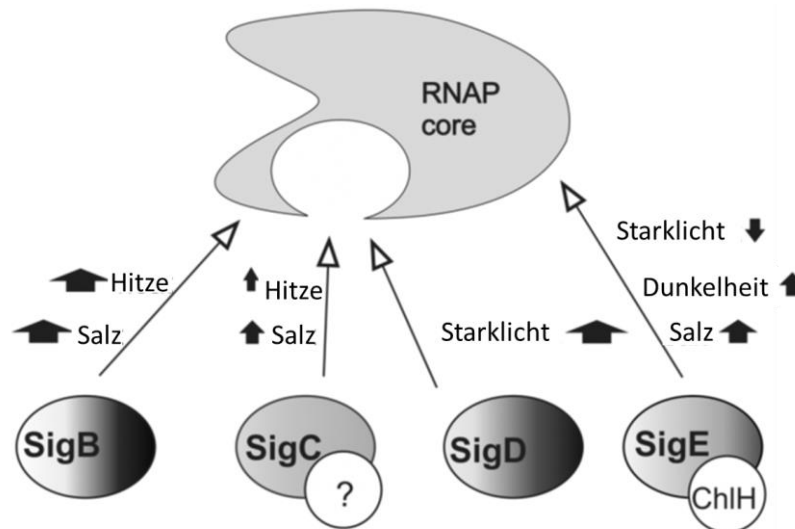
Das cyanobakterielle Coreenzym der RNAP besteht neben den vier Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\omega$  aus einer weiteren, für Cyanobakterien spezifischen Untereinheit, der  $\gamma$ -Untereinheit. Zusammen mit dem Sigmafaktor bilden sie das RNAP-Holoenzym ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$ ,  $\gamma$  und  $\sigma$ ). Im Gegensatz zu *E. coli* besitzen Cyanobakterien ausschließlich Vertreter der Sigmafaktorfamilie  $\sigma^{70}$  (Übersichtsartikel Gruber & Gross (2003) sowie Imamura & Asayama (2009)).

Die in *Synechocystis* vorkommenden Sigmafaktoren werden in drei Gruppen unterteilt (Kaneko *et al.*, 1996): Einziger Vertreter der Gruppe 1 ist der Hauptsigmafaktor SigA, der für die Transkription essentieller Haushaltsgene relevant ist. Die Tatsache, dass die Inaktivierung des *sigA* Gens für die Zellen letal ist zeigt, dass SigA bei der globalen Genexpression eine zentrale Rolle spielt. Das Transkript- und Proteinlevel von SigA bleibt über die verschiedenen Wachstumsphasen hinaus konstant, während es unter diversen Stressbedingungen wie Hitze, Dunkelheit, Salzstress und Stickstoffmangel zu einer Abnahme der *sigA*-Expression kommt (Imamura *et al.*, 2003a; Imamura *et al.*, 2006; Krasikov *et al.*, 2012; Tuominen *et al.*, 2003).

Zur Gruppe 2 werden die vier Sigmafaktoren SigB, SigC, SigD und SigE gezählt, die nicht essentiell unter Standardwachstumsbedingungen sind, jedoch im Hinblick auf ihre Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit mit SigA aufweisen (Imamura *et al.*, 2003b; Pollari *et al.*, 2008). Sigmafaktoren der Gruppe 2 aus *Synechocystis* sind entscheidend für die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Sie sind die am umfangreichsten untersuchten Sigmafaktoren innerhalb der Cyanobakterien (Übersichtsartikel Osanai *et al.* (2008) und Imamura & Asayama (2009)). SigB spielt bei der Anpassung an diverse Stressbedingungen eine zentrale Rolle. Demnach wird die Expression von *sigB* unter erhöhten Salzkonzentrationen induziert (Nikkinen *et al.*, 2012). Zudem reguliert SigB die Anpassung an wechselnde Lichtbedingungen, beispielsweise beim Wechsel von Dunkelheit zu Licht (Summerfield & Sherman, 2007; Tuominen *et al.*, 2003) sowie bei Starklichtbedingungen: Eine  $\Delta sigCDE$ -Mutante, die SigB als einzigen Sigmafaktor der Gruppe 2 enthält, zeigte unter Starklichtbedingungen eine gesteigerte Resistenz gegenüber Photoinhibition von PSII (Hakkila *et al.*, 2014). Physiologische Untersuchungen einer SigB-Überexpressionsmutante zeigten außerdem, dass SigB für eine bis zu 20-fach gesteigerte Thermotoleranz und für eine verbesserte Toleranz gegenüber Butanol verantwortlich ist. Für die Stressantwort ist dabei eine SigB-abhängige Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies entscheidend, welche üblicherweise schnell nach einem durch Hitze oder Lösungsmittel ausgelösten Schock akkumulieren (Kaczmarzyk *et al.*, 2014). Weitere Studien verdeutlichten zudem, dass SigB die Transkription des *hspA* Gens, welches für das Hitzeschock-Protein HspA kodiert, reguliert (Tuominen *et al.*, 2006). Neben SigB ist auch SigC an der durch Hitzeschock ausgelösten Stressantwort beteiligt (Tuominen *et al.*, 2008). SigC reguliert dabei insbesondere die Anpassung an die durch Hitzeeinwirkung ausgelöste Abnahme anorganischen Kohlenstoffs in den Zellen (Gunnellius *et al.*, 2010). SigD reguliert in Zusammenspiel mit SigE die Anpassung an hohe Lichtintensitäten (Yoshimura *et al.*, 2007). Sowohl die *sigD*-Transkriptmenge als auch das SigD-Proteinlevel sind nach Überführung der Zellen von Normal- zu Starklichtbedingungen erhöht (Hihara *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003a). SigE ist neben der Beteiligung an der lichtinduzierten Stressantwort auch essentiell für die Anpassung an Stickstoffmangel. Unter Stickstoffmangelbedingungen wird die Expression von *sigE* durch den globalen Stickstoffregulator NtcA induziert. Zudem zeigten Zellen ohne funktionellen Sigmafaktor SigE nach Langzeitinkubation in Abwesenheit von Stickstoff eine verminderte Überlebensrate gegenüber Wildtyp-Zellen (Muro-Pastor *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist SigE an der Expression katabolischer Stoffwechselgene beteiligt (Osanai *et al.*, 2006; Osanai *et al.*, 2005).

Die von Koskinen *et al.* (2016) veröffentlichten Untersuchungen einer  $\Delta sigBCDE$ -Mutante zeigten, dass *Synechocystis*-Zellen ohne Sigmafaktoren der Gruppe 2 in der Lage sind, unter Standardwachstumsbedingungen zu überleben, jedoch ist ihre Anpassungsfähigkeit an verschiedene Stressbedingungen stark minimiert. Mittels einer *in vivo-pulldown*-Analyse konnte die Rekrutierung der Gruppe 2 Sigmafaktoren durch die RNAP unter Standardwachstumsbedingungen sowie unter diversen Stressbedingungen (Dunkelheit, Hitze, hohe Lichtintensität und Salz) untersucht werden (Abbildung 1.8). Die zuvor erläuterten regulatorischen Funktionen der einzelnen Sigmafaktoren der Gruppe 2 konnten durch diese Analysen bestätigt werden. Unter Hitze- und Salzstress ist ein starker Anstieg der SigB-assoziierten und ein schwacher Anstieg der SigC-assoziierten Holoenzyme zu

beobachten. Die Überführung der Zellen von Normal- zu Starklichtbedingungen führt zu einer verstärkten Rekrutierung von SigD. Bei Dunkelheit und bei Salzstress wurde ein höherer und während Starklichtbedingungen ein niedrigerer Wert der SigE-assoziierten RNAP-Holoenzyme ermittelt (Koskinen *et al.*, 2016).



**Abbildung 1.8. Stressabhängige Rekrutierung von Sigmafaktoren der Gruppe 2 durch die RNAP in *Synechocystis*.** Das Schema zeigt die Rekrutierung der Gruppe 2 Sigmafaktoren (SigB, SigC, SigD und SigE) durch das RNAP-Coreenzym in Abhängigkeit der dargestellten Stressbedingungen (Hitze, Salz, Starklicht und Dunkelheit). Die schwarzen Pfeile verdeutlichen die Ab- oder Zunahme der Holoenzym-Bildung mit dem jeweiligen Sigmafaktor während der einzelnen Stressbedingungen, wobei die Breite der Pfeile die Intensität widerspiegelt. Der Verlauf der Grauschattierung illustriert, inwieweit der Anteil von SigB, SigC, SigD und SigE am RNAP-Coreenzym während der verschiedenen Stressbedingungen variiert. ChlH: Anti-Sigmafaktor von SigE; ?: Regulator von SigC, der noch nicht identifiziert wurde. Verändert nach Koskinen *et al.* (2016).

Weiterführende Untersuchungen der  $\Delta sigBCDE$ -Mutante von Antal *et al.* (2016) zeigten, dass Sigmafaktoren der Gruppe 2 nicht essentiell sind für die Anpassung von *Synechocystis*-Zellen an Stickstoff-reduzierte Wachstumsbedingungen. Hingegen führt die Anwesenheit von SigB und SigD zu einer verstärkten Aktivierung von Genen unter Stickstoffmangelbedingungen, die für den Schutz gegen oxidativen Stress und für die Erhaltung der Photosyntheseleistung kodieren. Die Untersuchungen ergaben außerdem, dass die Sigmafaktoren der Gruppe 2 für die Überlebensfähigkeit und das Wiederanwachsen aus Langzeitwachstum unter Stickstoffmangelbedingungen eine entscheidende Rolle spielen (Antal *et al.*, 2016).

Die Sigmafaktoren der Gruppe 3 (SigF, SigG, SigH und SigI) unterscheiden sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und Funktionsweise deutlich von den Sigmafaktoren der Gruppen 1 und 2 (Imamura *et al.*, 2003b; Wösten, 1998). SigF ist entscheidend für die Biogenese der Pili-Proteine und für die Motilität der Zellen. Die Inaktivierung von *sigF* führt zu einer starken Reduzierung der Transkriptlevel von *pilA1* und *pilA2*. Dementsprechend äußert sich die *sigF*-Inaktivierung phänotypisch durch das Fehlen der Pili und den Verlust der phototaktischen Bewegung (Bhaya *et al.*, 1999). Während SigG essentiell ist für die Anpassung an wechselnde Umwelteinflüsse, konnte bei einer Inaktivierung

von *sigH* und *sigI* kein signifikanter Einfluss auf das Zellwachstum unter diversen Stressbedingungen ermittelt werden (Huckauf *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2003a).

Als bisher einziger Anti-Sigmafaktor in *Synechocystis* ist ChlH bekannt. ChlH bildet die H-Untereinheit der Magnesium-Chelatase, welche die Chl-Synthese katalysiert (Osanaï *et al.*, 2009). ChlH assoziiert in Abhängigkeit von Licht an SigE und inhibiert auf diese Weise dessen Rekrutierung durch die RNAP (Abbildung 1.8; Osanaï *et al.* (2009)).

## 1.5. Adaptation an Stickstoffmangel

In ihren natürlichen Habitaten sind Cyanobakterien sich stets ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Wichtige Nährstoffe wie die Elemente Eisen, Kupfer, Phosphor und Stickstoff sind dabei oft nur begrenzt vorhanden. Mithilfe ihres vielseitigen Metabolismus haben sich Cyanobakterien an diese Bedingungen angepasst. Je nach Nährstoffmangel unterscheiden sich dabei die Adaptationsmechanismen. Einige zelluläre Stressantworten sind höchst spezifisch. So aktivieren sie die Synthese bestimmter Nährstofftransporter oder die Synthese von Enzymen, die für die Umwandlung des Nährstoffes in eine für die Zelle verwertbare Form zuständig sind. Andere Adaptationsmechanismen führen zu umfassenden Änderungen der Zellmorphologie, der physiologischen Prozesse und der intrazellulären Nährstoffreserven (Grossman *et al.*, 2004).

Im Folgenden wird die Adaptation an Stickstoffmangel näher erläutert: Cyanobakterien können eine Vielzahl von Verbindungen, wie Ammonium, Nitrat und Nitrit als Stickstoffressourcen verwerten. Dabei sind zwei Strategien der Stickstoffverwertung in Cyanobakterien zu unterscheiden: Diazotrophe Cyanobakterien, die in der Lage sind, Stickstoff mithilfe des Enzyms Nitrogenase aus der Umwelt zu fixieren und dadurch unabhängig von der Stickstoffverfügbarkeit wachsen können und nicht-diazotrophe Cyanobakterien, die bei Abwesenheit von Stickstoffquellen ihren gesamten Metabolismus von Anabolismus in eine Art stationäres Wachstum umstellen. *Synechocystis* und *Synechococcus* gehören zu den nicht-diazotrophen Cyanobakterien (Übersichtsartikel Schwarz & Forchhammer (2005)). Sofern die extrazelluläre Stickstoffverfügbarkeit abnimmt und der Bedarf nicht mehr gedeckt wird, beginnt ein schrittweiser Adaptationsprozess. Um intrazellulär gebundenen Stickstoff verfügbar zu machen, beginnt wenige Stunden nach dem Entzug von Stickstoff der proteolytische Abbau der Phycobilisomen, den Antennenproteinen der Lichtsammelkomplexe (Collier & Grossman, 1992; Collier & Grossman, 1994; Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). Da Phycobilisomen bis zu 50 % des Gesamtproteingehalts ausmachen (Grossman *et al.*, 1993), äußert sich der Abbau in einer deutlichen Abnahme der Gesamtproteinmenge sowie in einem Farbumschlag der Zellen von grün-blau zu gelb, was als Chlorose bezeichnet wird (Allen & Smith, 1969). In der zweiten Phase der Anpassung kommt es zur Speicherung von Kohlenstoffpolymeren in Form von Glykogen (Schwarz & Forchhammer, 2005) und Polyhydroxybutyrat (Hauf *et al.*, 2013; Panda *et al.*, 2006) sowie zum Abbau von Chlorophyll *a*. Dies hat eine Reduktion der Photosyntheserate zur Folge (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). In Folge dessen geht die Zelle in einen stationären Zustand über und ist in der Lage, auch längere Zeitspannen

unter Mangelbedingungen zu überleben. Untersuchungen zeigten, dass reprimierte Zellen nach Zugabe einer Stickstoffquelle innerhalb weniger Tage wieder anwachsen können, was sich in einem Farbumschlag von gelb zu blau-grün widerspiegelt (Görl *et al.*, 1998). Die Anpassung an Stickstoffmangel ist zudem durch einen dynamischen Wechsel der Genexpression geprägt: Innerhalb der ersten vier Stunden unter Stickstoffmangel ist eine Induktion von Genen der Stickstoffassimilierung und eine Abnahme von Transkripten der ribosomalen Proteine und Photosynthese zu beobachten (Osanai *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass nach zwölf Stunden zusätzlich die Genexpression der Phycobilisomen und der Kohlenstoffassimilierung runterreguliert waren, während nach 96 Stunden sämtliche Prozesse, mit Ausnahme der PSI-Genexpression, reprimiert waren (Krasikov *et al.*, 2012). Einen der wichtigsten Regulatoren des Stickstoffmetabolismus stellt der Transkriptionsfaktor NtcA dar, der die Transkription einer Vielzahl von Genen steuert (Übersicht in Herrero *et al.* (2001)) und der u. a. die Expression der durch Stickstoffmangel induzierten sRNA NsiR4 aktiviert (Klähn *et al.*, 2015).

## 1.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die 6S RNA gehört zu den am besten untersuchten sRNAs überhaupt. Ihre Struktur, Mechanismus und regulatorische Funktion sowie die Biogenese sind für die 6S RNA aus *E. coli* und *B. subtilis* ausführlich beschrieben worden. Da sich Cyanobakterien als phototrophe Organismen in ihrer Lebensweise und Energiegewinnung stark von Proteobakterien und Firmicuten unterscheiden, stellte sich zu Beginn der Arbeit die Frage, inwieweit sich die bekannten Eigenschaften auf die cyanobakterielle 6S RNA übertragen lassen. Nachdem sich erste Veröffentlichungen hauptsächlich mit der Struktur und dem Mechanismus cyanobakterieller 6S RNAs auseinandergesetzt haben, sollte in der vorliegenden Arbeit als Hauptziel die regulatorische Funktion der 6S RNA für die Transkriptionsregulation in Cyanobakterien am Beispiel des Modellorganismus *Synechocystis* beleuchtet werden. Zudem sollte untersucht werden, ob gegebenenfalls weitere Regulatoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Für die regulatorische Funktion der 6S RNA ist das Transkriptakkumulationsmuster ein entscheidender Faktor. Daher war es das Ziel zu untersuchen, wie sich das Akkumulationsmuster in *Synechocystis* während des Zellwachstums verhält und ob es Parallelen zu den bekannten Daten anderer Cyanobakterien (*Synechococcus* und *Prochlorococcus*) gibt.

Ein weiterer entscheidender Aspekt der Arbeit war die Analyse des Einflusses von 6S RNA auf die zelluläre Stressantwort unter wechselnden Umwelteinflüssen, da dies ebenfalls Aufschluss über die regulatorische Funktion geben sollte. Dabei sollten unter Verwendung einer *Synechocystis*-6S RNA-Deletionsmutante und einer Überexpressionsmutante die Auswirkungen auf die physiologischen Eigenschaften ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurde die Lichtsensitivität der Stämme unter Starklichtbedingungen und ihre Thermotoleranz untersucht. Im besonderen Fokus der Arbeit stand die Analyse der Anpassung an wechselnde Stickstoffbedingungen und hierbei im Speziellen das Wiederaanwachsen aus Stickstoffmangelbedingungen, da dies dem *Outgrowth* aus der stationären Phase in *E. coli* ähnelt. Neben physiologischen und photosynthetischen Parametern sollte hierbei auch auf Transkriptomebene mittels *Microarray*-Analyse der Einfluss von 6S RNA untersucht werden. Um anschließend Rückschlüsse auf die Transkriptionsregulation ziehen zu können, galt es in diesem Zusammenhang die Frage zu beantworten, ob sich der intrazelluläre Proteingehalt der Gruppe 1 und 2 Sigmafaktoren sowie ihre Rekrutierung durch die RNAP in Abhängigkeit von der 6S RNA ändert. Dies sollte mittels *in vivo-pulldown*-Analysen ebenfalls unter Verwendung der 6S RNA-Deletionsmutante beantwortet werden. Zur Klärung, ob die 6S RNA-vermittelte Regulation unter wechselnden Stickstoffbedingungen durch eine Änderung des 6S RNA-Transkriptlevels einhergeht, sollte auch hierbei die 6S RNA-Transkriptmenge im zeitlichen Verlauf ermittelt werden.

Im Vorfeld der Arbeit war auf Grundlage von *in vitro*-Analysen mit *Synechocystis*-6S RNA und *E. coli*-RNAP sowie durch den Nachweis des Transkriptionsstartpunktes der pRNA mittels RNA-Sequenzierung bekannt, dass die 6S RNA in *Synechocystis* als potentiell *Template* für die pRNA-Synthese dienen kann. Daher galt es zu überprüfen, ob und unter welchen Umständen die Synthese von pRNA-Transkripten in *Synechocystis in vivo* nachgewiesen werden kann.



## 2. Ergebnisse

In den folgenden Unterkapiteln sind die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur regulatorischen Funktion der 6S RNA in Cyanobakterien beschrieben. Zunächst wurde dabei das 6S RNA-Transkriptlevel in Abhängigkeit der verschiedenen Zellwachstumsphasen analysiert. Anschließend wurde die regulatorische Funktion der 6S RNA *in vivo* unter Verwendung einer 6S RNA-Deletionsmutante untersucht. Hierfür wurden vergleichende Analysen unter photoautotrophen und photoheterotrophen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der 6S RNA auf die Adaptation an die Stressbedingungen Stark- und Schwachlicht sowie Hitze und Stickstoffmangel untersucht. Dabei wurde insbesondere die funktionelle Rolle der 6S RNA während der Regeneration nach Stickstoffmangel durch vergleichende physiologische und genomische Analysen sowie durch *in vivo*-Nachweis der Rekrutierung von Sigmafaktoren durch die RNAP betrachtet. Schließlich wurde das 6S RNA-Transkriptlevel sowie die Synthese von pRNA-Transkripten unter Stickstoffmangelbedingungen und Regeneration untersucht.

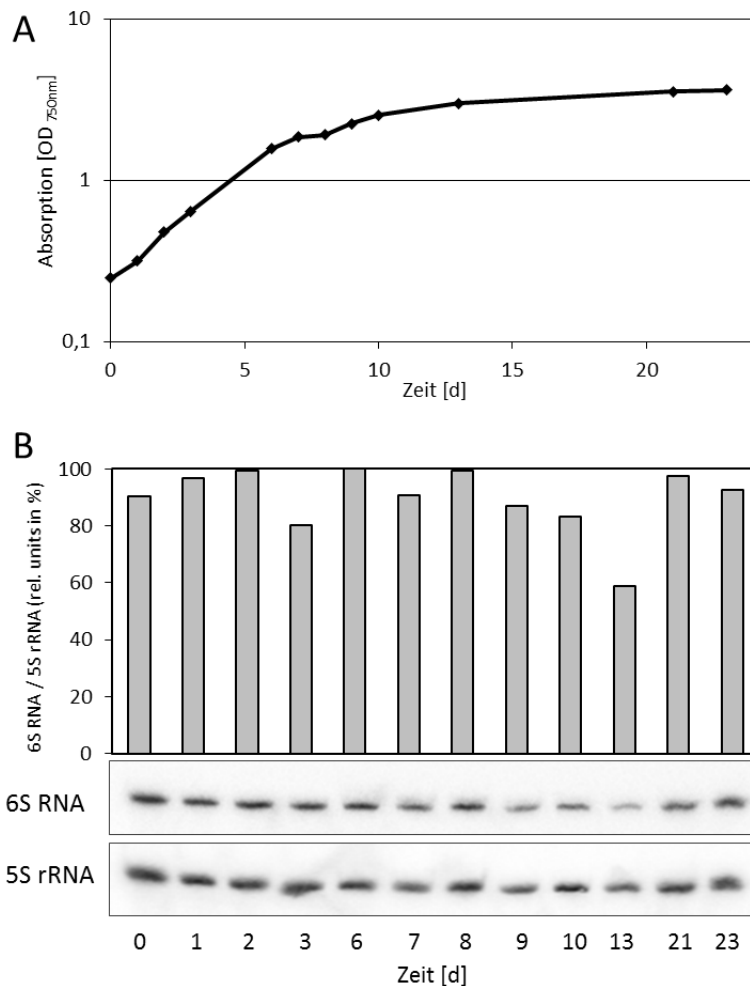
Für die hier gezeigten Arbeiten wurde ausschließlich der Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ordnung: Chroococcales) verwendet. In *Synechocystis* kodiert das Gen *ssaA* für die ~ 188 nt lange 6S RNA.

### 2.1. Wachstumsphasen-abhängige 6S RNA-Transkriptakkumulation unter phototrophen und photoheterotrophen Bedingungen

Die regulatorische Funktion der 6S RNA hängt entscheidend mit der 6S RNA-Transkriptmenge und deren Akkumulation in der Zelle während des Zellwachstums zusammen. In *E. coli* akkumuliert sie während des zellulären Wachstums von ~ 1.000 auf ~ 10.000 Kopien pro Zelle (Wassarman & Storz, 2000). Für Cyanobakterien wurden bisher gegenläufige 6S RNA-Akkumulationsmuster beobachtet. Für *Synechococcus elongatus* PCC 6301 wurden während der frühen, mittleren und späten exponentiellen Wachstumsphase hohe 6S RNA Transkriptlevel ermittelt, gefolgt von einem starken Rückgang in der stationären Phase (Watanabe *et al.*, 1997). Das Akkumulationsverhalten der beiden 6S RNA-Homologe des marinen Cyanobakteriums *Prochlorococcus* MED4 unterscheidet sich deutlich voneinander. Während das kürzere Transkript von Wachstumsbeginn (lag Phase) bis zum Erreichen der stationären Phase stetig akkumuliert und anschließend leicht zurückgeht, nimmt die Menge des längeren Transkripts bis zum Ende der exponentiellen Phase stark zu und danach drastisch wieder ab (Axmann *et al.*, 2007).

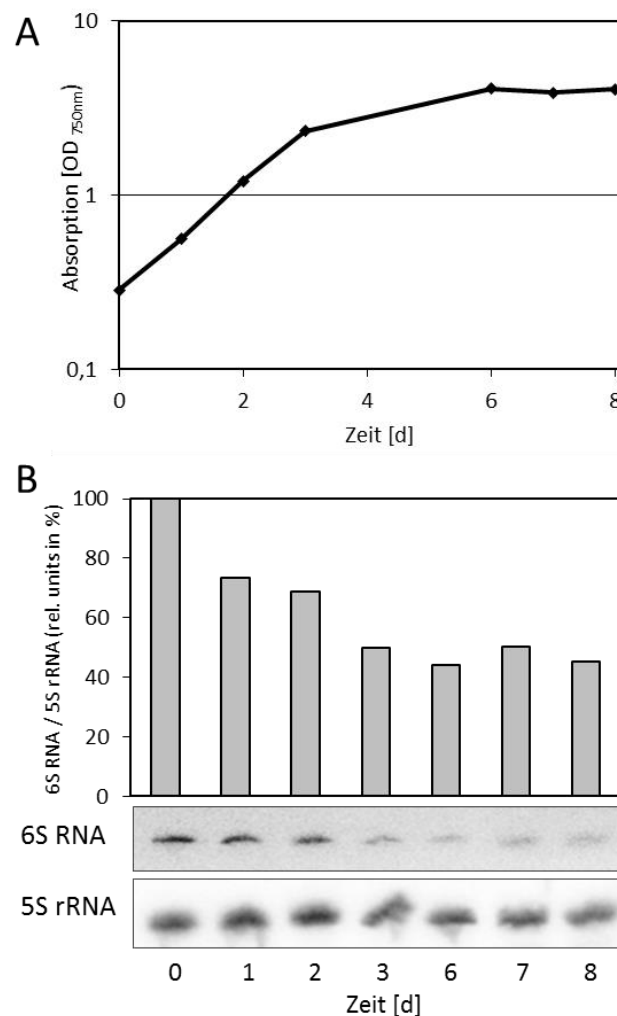
Vor diesem Hintergrund wurde die Expression der 6S RNA-Transkripte in *Synechocystis* während der verschiedenen Wachstumsphasen untersucht. Für den Versuchsablauf wurden die Zellen zum einen unter phototrophen (Abbildung 2.1) und zum anderen unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen in Gegenwart von 10 mM Glukose als exogene Kohlenstoffquelle (Abbildung 2.2) kultiviert. Unter phototrophen Wachstumsbedingungen erreichten die Zellen nach etwa 13 Tagen

bei einer  $OD_{750nm}$  von  $\sim 3,1$  die stationäre Phase (Abbildung 2.1 A). Das 6S RNA-Transkriptlevel blieb während der exponentiellen Wachstumsphase konstant, mit leichten Schwankungen von bis zu  $\sim 20\%$  (Zeitpunkte 0 - 8 d; Abbildung 2.1 B). Ab dem neunten Tag wurde mit Eintreten der früh-stationären Phase ein starker Rückgang der Expression ermittelt. Das geringste 6S RNA-Transkriptlevel wurde am 13. Tag gemessen. In der spät-stationären Phase (Zeitpunkte 21 und 23 d) hatte sich das 6S RNA-Transkriptlevel wieder den Werten, die während der frühen Wachstumsphase gemessen wurden, angeglichen (Abbildung 2.1 B).



**Abbildung 2.1. Untersuchung der 6S RNA-Transkriptmenge während phototrophen Wachstums von *Synechocystis*-Zellen.** **A:** Wachstumskurve des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes, aufgenommen über einen Zeitraum von 23 Tagen. Die Zellen wurden in Flüssigmedium (1 x BG11-Medium) bei 30 °C unter kontinuierlicher Begasung bei einer Lichtintensität von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  unter photoautotrophen Bedingungen kultiviert. Die Absorption der Zellen wurde zu den dargestellten Zeitpunkten (nach 0, 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 21 und 23 Tagen (d)) spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Proben zur Analyse des 6S RNA-Transkriptlevels entnommen. **B:** 6S RNA-Transkriptmenge im Verlauf des Zellwachstums. Je 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden über ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Elektro-Blotting auf eine Nylonmembran übertragen. Die Northern Blot-Hybridisierung erfolgte mit spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonden, gerichtet gegen 6S RNA- und 5S rRNA-Transkripte. Die Intensität der 6S RNA-Banden wurde quantifiziert und gegen die Intensität der 5S rRNA-Banden (Ladekontrolle) korrigiert. Die Intensitäten wurden auf den höchsten Wert der 6S RNA-Transkriptmenge normiert und dieser wurde auf 100 % gesetzt.

Unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen verlief das Zellwachstum aufgrund der zusätzlichen Kohlenstoffquelle (10 mM Glukose) beschleunigt ab. Bereits nach sechs Tagen wurde bei einer  $OD_{750nm}$  von  $\sim 4,1$  die stationäre Phase erreicht (Abbildung 2.2 A). Interessanterweise nahm die Menge an 6S RNA-Transkripten unter diesen Wachstumsbedingungen bereits während der exponentiellen Phase ab Zeitpunkt 1 d stark ab und erreichte in der stationären Phase das niedrigste Expressionslevel, mit einem Rückgang von  $\sim 55$  %. Während der stationären Wachstumsphase blieb das 6S RNA-Transkriptlevel überwiegend konstant (Abbildung 2.2 B).



**Abbildung 2.2. Untersuchung der 6S RNA-Transkriptmenge während photoheterotrophen Wachstums von *Synechocystis*-Zellen.** **A:** Wachstumskurve des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes, dokumentiert über einen Zeitraum von acht Tagen. Die Kultivierung erfolgte in Flüssigmedium (1 x BG11-Medium) unter photoheterotrophen Bedingungen (10 mM Glukose) bei 30 °C unter kontinuierlicher Begasung bei einer Lichtintensität von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Das Zellwachstum wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm spektrophotometrisch ermittelt. Nach 0, 1, 2, 3, 6, 7 und 8 Tagen (d) wurden Proben zur Analyse des 6S RNA-Transkriptlevels entnommen. **B:** Northern Blot-Analyse des 6S RNA-Transkriptlevels unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen. Die Auftrennung von je 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA erfolgte über ein 10%iges Polyacrylamidgel mit anschließendem Elektro-Blotting. Zum Nachweis von 6S RNA- und 5S rRNA-Transkripten wurden spezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonden für die Northern Blot-Hybridisierung verwendet. Die Bandenintensität der 6S RNA-Transkripte wurde quantifiziert und gegen die Intensität der 5S rRNA-Transkripte (Ladekontrolle) korrigiert. Die Werte wurden auf den höchsten Wert der 6S RNA-Transkriptmenge normiert und dieser wurde auf 100 % gesetzt.

Die Untersuchungen zur Expressionsanalyse von 6S RNA-Transkripten zeigen, dass die Akkumulation in Abhängigkeit der jeweiligen Wachstumsphase verlief. Mit zunehmender Zelldichte nahm die Expression von 6S RNA-Transkripten in *Synechocystis* leicht ab. Dieser Effekt wurde unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Glukose zusätzlich verstärkt.

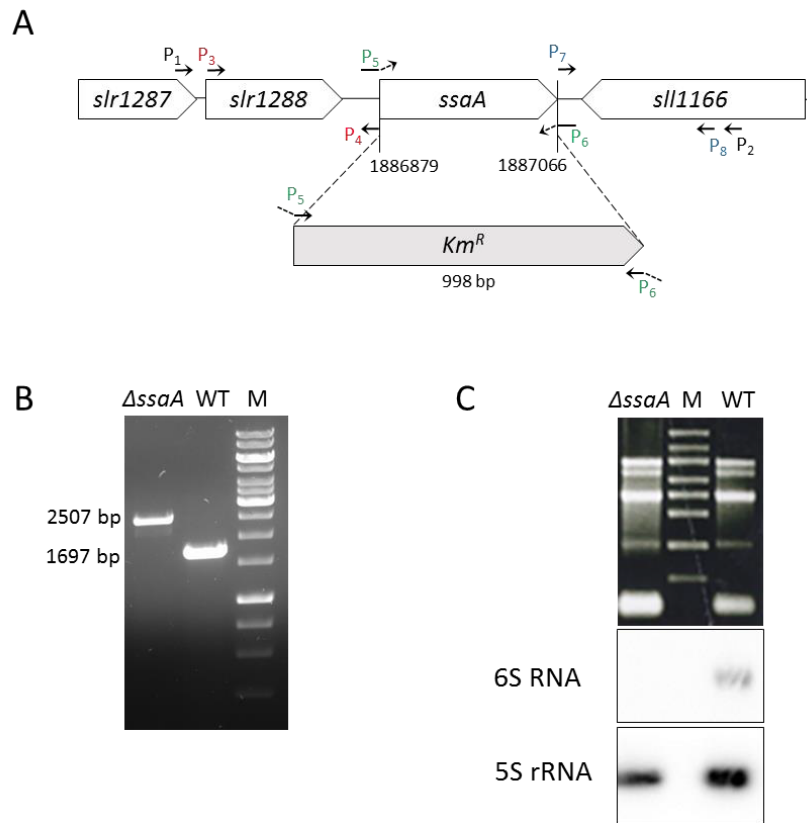
## 2.2. Charakterisierung der Funktion von 6S RNA unter diversen Wachstums- und Stressbedingungen

Auf Grundlage der Untersuchungen des Akkumulationsmusters von 6S RNA-Transkripten in *Synechocystis* (Abschnitt 2.1) wurde anschließend die regulatorische Funktion der 6S RNA analysiert. Dafür wurden zunächst eine 6S RNA-Deletions-Mutante ( $\Delta ssaA$ ) und dementsprechend auch eine 6S RNA-Komplementations-Mutante ( $\Delta ssaA-C$ ) in *Synechocystis* generiert. Außerdem wurde eine 6S RNA-Überexpressions-Mutante (6S(+)) für weitere Analysen hergestellt. Die Stämme wurden anschließend unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen phänotypisch und teilweise auch genetisch charakterisiert.

### 2.2.1 Konstruktion einer $\Delta ssaA$ -Mutante

Die Planung sowie die Klonierungsarbeiten zur Konstruktion einer  $\Delta ssaA$ -Mutante wurden von Frau Dr. Anne Rediger (Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt. Die Überprüfung der Klonierungsarbeiten erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Zur Generierung einer  $\Delta ssaA$ -Mutante wurde mittels Overlap-Extension-PCR ein aus drei Fragmenten bestehendes Konstrukt erstellt, welches die Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ( $Km^r$ ), deren Promotor- und Transkriptionsterminatorregion sowie die sich jeweils  $\sim 700$  bp *upstream* und *downstream* von *ssaA* befindlichen flankierenden Genombereiche enthielt (Rediger *et al.*, 2012). Die flankierenden Bereiche enthielten Gensegmente der Loci *slr1288* und *sll1166*, die durch die Klonierung jedoch nicht unterbrochen wurden. Das Konstrukt wurde über homologe Rekombination in *sense* Orientierung in den Klonierungsvektor pJET1.2 kloniert und anschließend für die Transformation des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes verwendet (Ermakova *et al.*, 1993) (Abbildung 2.3 A). Die erhaltenen Klone wurden über ein Festmedium mit Kanamycin (Km) selektiert und die vollständige Segregation mittels PCR unter Verwendung der Primer P<sub>1</sub> ( $\Delta ssaA_{700up-Fw}$ ) und P<sub>2</sub> ( $\Delta ssaA_{700down-Rv}$ ) analysiert (Abbildung 2.3 B). Die Deletion der 6S RNA wurde zudem mithilfe einer Northern Blot-Analyse überprüft und bestätigt (Abbildung 2.3 C).



**Abbildung 2.3. Generierung einer  $\Delta ssaA$ -Mutante in *Synechocystis*.** **A:** Schematische Illustration der Strategie zur Mutagenese von *ssaA*. Das deletierte *ssaA* Gen wurde an der Genomposition zwischen 1886879 und 1887066 durch eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ( $Km^R$ ) und dessen Promotor- und Terminatorregion (insg. 998 nt; dargestellt durch eine graue Box) ersetzt. Für die Generierung wurde eine Overlap-Extension-PCR unter Verwendung der Primerpaare  $P_3$  und  $P_4$  (rot;  $P_3$ : *slr1288\_Fw* und  $P_4$ : 3' *slr1288\_Rv*),  $P_5$  und  $P_6$  (grün;  $P_5$ : *Km\_Fw*, 15 bp Überschneidung am 5'-Ende mit  $P_4$  und 17 bp Überschneidung am 3'-Ende mit  $Km^R$ ;  $P_6$ : *Km\_Rv*, 14 bp Überschneidung am 5'-Ende mit  $P_7$  und 24 bp Überschneidung am 3'-Ende mit  $Km^R$ ) sowie  $P_7$  und  $P_8$  (blau;  $P_7$ : *sll1166\_Fw* und  $P_8$ : 3' *sll1166\_Rv*) zur Erzeugung eines Konstruktes mit drei Fragmenten vorgenommen. Das Konstrukt wurde anschließend über homologe Rekombination in das *Synechocystis* Genom integriert. Die flankierenden Gene *slr1287*, *slr1288* und *sll1166* sind *upstream* bzw. *downstream* von *ssaA* dargestellt. **B:** PCR zur Überprüfung der vollständigen Segregation in  $\Delta ssaA$  und der Insertion von  $Km^R$ , durchgeführt mit dem Primerpaar  $P_1$  und  $P_2$  (siehe **A**:  $P_1$ :  $\Delta ssaA\_700up-Fw$  und  $P_2$ :  $\Delta ssaA\_700down-Rv$ ). Die PCR-Produkte wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Midori Green gefärbt. M: Größenstandard (1kb DNA Ladder) **C:** Analyse der 6S RNA-Deletion in der  $\Delta ssaA$ -Mutante mittels Northern Blot. Je 3  $\mu g$  Gesamt-RNA, isoliert aus exponentiell wachsenden Zellen einer Flüssigkultur, wurden über ein 1,3%iges, denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die 6S RNA mit einer spezifischen [ $\alpha P^{32}$ ]-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung der Nylonmembran mit einer radioaktiv markierten 5S rRNA-DNA-Sonde diente als Ladekontrolle. WT: Wildtyp; M: Größenstandard (High Range RNA Ladder). (Heilmann *et al.*, 2017)

Neben der  $\Delta ssaA$ -Mutante, welche die eingesetzte  $Km^R$  in *sense* Orientierung aufweist (Abbildung 2.3 A), wurde eine weitere *ssaA*-Deletions-Mutante erstellt, welche die  $Km^R$  in *anti-sense* Orientierung kodiert. Vergleichende Wachstumsanalysen der beiden *ssaA*-Deletions-Mutanten haben ergeben, dass sich beide Mutanten identisch verhalten (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgenden Daten sind ausschließlich unter Verwendung der  $\Delta ssaA$ -Mutante entstanden, welche die  $Km^R$  in *sense* Orientierung besitzt.

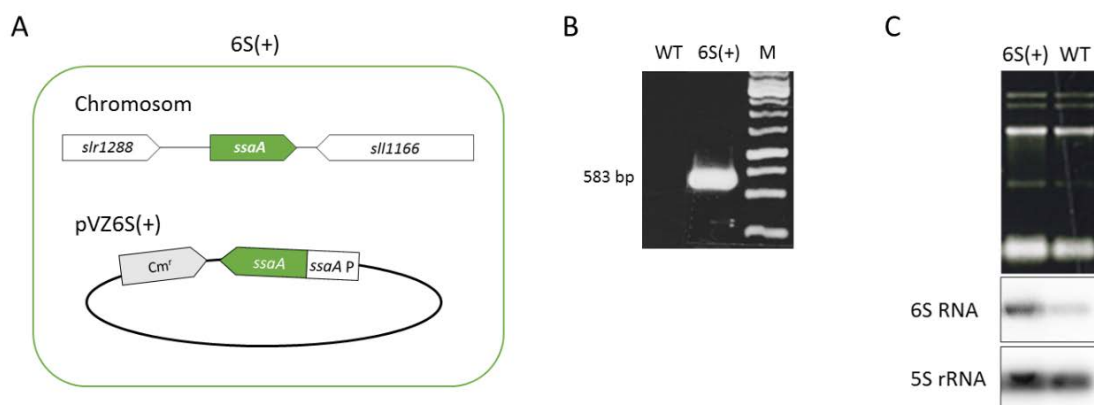
### 2.2.2 Konstruktion einer $\Delta ssaA$ -C Komplementationsmutante

Zur Komplementierung der  $\Delta ssaA$ -Mutante (Abschnitt 2.2.1) wurde der Locus *ssaA* und dessen Promoterregion (~ 150 bp *upstream* von *ssaA*) in den autonom replizierenden Shuttle-Vektor pVZ321 ligiert (zuvor durchgeführt von Frau Dr. Anne Rediger, Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin). Eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette ( $Cm^r$ ) auf dem pVZ321 Vektor diente der späteren Selektion. Das hergestellte pVZ6S(+)-Konstrukt wurde unter Verwendung des Helferplasmids RP4 über konjugativen Gentransfer in die  $\Delta ssaA$ -Mutante transferiert. Die Selektion der Klone erfolgte über ein Km- und Cm-haltiges Festmedium. Der erfolgreiche Plasmidtransfer wurde mittels Sequenzierung und PCR analysiert (Daten nicht gezeigt). Die komplementierte Mutante wird nachfolgend als  $\Delta ssaA$ -c bezeichnet.

### 2.2.3 Konstruktion einer 6S(+)-Mutante

Die Generierung einer 6S(+)-Mutante wurde ebenfalls von Frau Dr. Anne Rediger (Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) im Vorfeld dieser Arbeit geplant und zum Teil durchgeführt. Die Selektionierung sowie Überprüfung der Klonierungsarbeit wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Für die Konstruktion der 6S(+)-Mutante wurde der Locus *ssaA* und dessen Promoterregion (150 bp *upstream* von *ssaA*) in den autonom replizierenden *Shuttle*-Vektor pVZ321 (Zinchenko *et al.*, 1999) ligiert (Abbildung 2.4 A).



**Abbildung 2.4. 6S RNA Überexpression in *Synechocystis*.** **A:** Schematische Repräsentation der Mutagenese zur Überexpression von *ssaA*. Das *ssaA*-Gen sowie der *ssaA*-Promotorbereich (*ssaA* P: ~ 150 bp *upstream* von *ssaA*) wurden in den autonom replizierenden Vektor pVZ6S(+) ligiert, welcher zur weiteren Selektion eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette ( $Cm^r$ ; graue Box) enthielt. **B:** PCR zum Nachweis der Replikation von pVZ6S(+) in der 6S(+)-Mutante unter Verwendung der Primer pVZ\_Xho\_Fw und pVZ\_Xba\_Rv. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über ein 1%iges Agarosegel. Für die Färbung wurde Midori Green verwendet. **C:** Nachweis der 6S RNA-Transkripte in der 6S(+)-Mutante mittels Northern Blot Analyse. Aus exponentiell wachsenden Zellen einer 6S(+)- und einer Wildtyp-Flüssigkultur wurde Gesamt-RNA isoliert und je 2 µg über ein 1,3%iges, denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die 6S RNA mit einer spezifischen [ $\alpha$   $P^{32}$ ]-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente eine 5S rRNA-DNA-Sonde. WT: Wildtyp; M: Größenstandard (1kb DNA Ladder).

Zusätzlich kodiert das Plasmid eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette (Cm<sup>r</sup>) zur Selektion. Das pVZ-6S(+)-Konstrukt wurde durch Gebrauch des konjugativen Helferplasmids RP4 in *Synechocystis* Wildtyp-Zellen transferiert. Die resultierenden Klone wurden über Cm-haltiges Festmedium selektiert. Mittels PCR-Analyse wurde der erfolgreiche Plasmidtransfer bestätigt (Primerpaar: pVZ\_Xho\_Fw und pVZ\_Xba\_Rv; Abbildung 2.4 B). Die Überexpression von 6S RNA in der 6S(+)-Mutante wurde mithilfe einer Northern Blot-Analyse überprüft (Abbildung 2.4 C). Für die 6S(+)-Mutante wurde im Verhältnis zum Wildtyp eine drei- bis vierfach höhere Expressionsrate für die 6S RNA ermittelt.

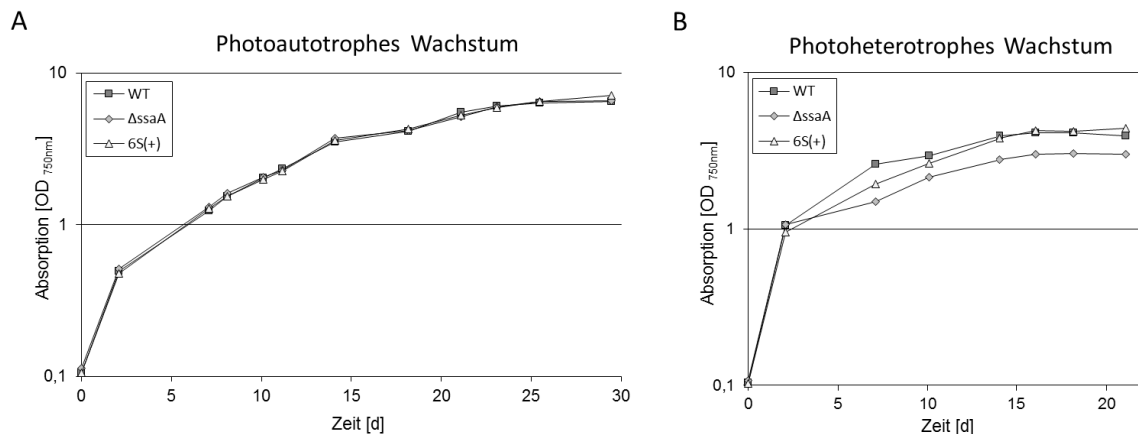
#### 2.2.4 Wachstum unter photoautotrophen und photoheterotrophen Bedingungen

Eine funktionelle Analyse der 6S RNA durch Deletion oder Inaktivierung des 6S RNA-kodierenden Gens wurde bereits bei einer Vielzahl von Prokaryoten durchgeführt. Für *E. coli* konnte kein ausgeprägter phänotypischer Effekt von 6S RNA-defizienten Zellen bei Wachstum unter Standardbedingungen beobachtet werden (Wassarman & Storz, 2000). Untersuchungen zum Wachstum unter stationären Langzeitbedingungen zeigten für 6S RNA-defiziente Zellen eine leicht reduzierte Überlebensrate (Trotochaud & Wassarman, 2004). Für Cyanobakterien wurde der Einfluss der Deletion von 6S RNA auf das Wachstum bisher noch nicht beschrieben. Da sich Cyanobakterien im Hinblick auf ihren Metabolismus und ihre Energiegewinnung stark von Proteobakterien unterscheiden, sollte im Folgenden untersucht werden, ob es spezifische Parallelen oder Unterschiede zwischen der cyanobakteriellen 6S RNA und 6S RNA-Homologen anderer Prokaryoten gibt. Dafür wurde zunächst das Wachstum der *ΔssaA*- und 6S(+)-Mutante unter photoautotrophen und unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen analysiert. Flüssigkulturen von Wildtyp-, *ΔssaA*- und 6S(+)-Stamm wurden unter konstanten photoautotrophen Standardbedingungen (30 °C, kontinuierliche Begasung mit steriler Raumluft) und durchgehender Belichtung mit  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Zusätzlich wurde das Wachstumsverhalten unter konstanten photoheterotrophen Bedingungen, durch Zusatz von 5 mM Glukose untersucht.

Die Wachstumsanalyse in Abwesenheit organischer Kohlenstoffquellen (photoautotrophes Wachstum) zeigt, dass weder die Deletion des *ssaA*-Gens, noch die Überexpression von 6S RNA einen Einfluss auf das Wachstum unter Standardbedingungen hat (Abbildung 2.5 A). Alle drei *Synechocystis*-Kulturen zeigten einen nahezu identischen Wachstumsverlauf, der sich in den ersten Tagen logarithmisch verhielt, sich dann langsam abschwächte und sich nach mehr als drei Wochen bei einer Zelldichte von  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 6,5$  einem stationären Plateau anglich. Vergleichende Untersuchungen zum Wachstum in Anwesenheit von 5 mM Glukose (photoheterotrophes Wachstum) ergaben während der logarithmischen Wachstumsphase keine Defizite der beiden Mutanten (*ΔssaA* und 6S(+)) gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 2.5 B). Anders verhielt es sich hingegen in der spätlogarithmischen Wachstumsphase, in der das stärkste Wachstum für den Wildtyp verzeichnet wurde (sechs bis zehn Tage). Die 6S(+)-Mutante zeigte zu dieser Phase ein leicht verringertes Wachstum, näherte sich jedoch in der stationären Phase wieder den Werten des Wildtyp-Stammes an. Sowohl Wildtyp- als auch 6S(+)-Stamm erreichten unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen eine maximale Zelldichte

von  $OD_{750nm} = 4,1$ . Während der spätlogarithmischen und stationären Wachstumsphase wurde für  $\Delta ssaA$  ein vermindertes Wachstum beobachtet. Der zeitliche Verlauf der Wachstumsphasen glich denen des Wildtyp-Stammes,  $\Delta ssaA$  erreichte die stationäre Phase jedoch bei einer geringeren Zelldichte ( $OD_{750nm} = 3,0$ ; Abbildung 2.5 B).

Insgesamt betrachtet fällt auf, dass allen drei *Synechocystis*-Kulturen die stationäre Wachstumsphase unter photoheterotrophen Bedingungen einige Tage früher und bei niedrigeren Zelldichten erreichten als unter photoautotrophen Bedingungen (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5. Wachstumsanalyse von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta ssaA$ - und 6S(+)-Mutante in Flüssigkultur.** *Synechocystis* Wildtyp-,  $\Delta ssaA$ - und 6S(+)-Zellen wurden jeweils in Flüssigmedium (1 x BG11-Medium) bei 30 °C unter kontinuierlicher Begasung bei einer Lichtintensität von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  unter photoautotrophen Bedingungen (A) und unter photoheterotrophen Bedingungen in Gegenwart von 5 mM Glukose (B) kultiviert. Alle Kulturen wurden zu Versuchsbeginn auf eine  $OD_{750nm}$  von 0,1 eingestellt. Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde alle zwei bis fünf Tage spektrophotometrisch bei 750 nm vermessen. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten von zwei biologischen Replikaten.

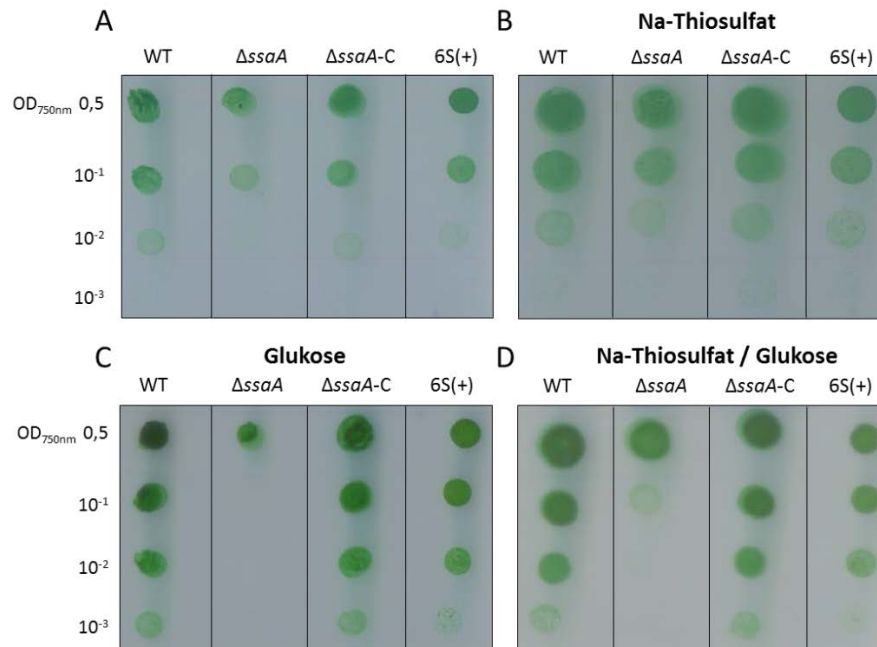
Bei der Kultivierung unter Tag-Nacht-Bedingungen (12 h Licht / 12 h Dunkelheit) und bei konstanter Temperatur von 30 °C wurde in  $\Delta ssaA$ - und 6S(+)-Zellen kein Effekt im Hinblick auf Wachstum und Physiologie im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (Daten nicht gezeigt).

### 2.2.5 Analyse der Lichtsensitivität von $\Delta ssaA$

Nach der Wachstumsanalyse in Flüssigmedium (Abbildung 2.5) wurde im Folgenden das Wachstumsverhalten von Wildtyp,  $\Delta ssaA$ -,  $\Delta ssaA$ -C- und 6S(+)-Mutante auf Agar-Festmedium analysiert. Entsprechend der in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Versuche wurde unter photoautotrophen und unter photoheterotrophen Bedingungen angezogen. Darüber hinaus wurden beide Wachstumsbedingungen zusätzlich in Anwesenheit von Na-Thiosulfat untersucht. Na-Thiosulfat ist ein Reagenz, welches reaktive Sauerstoffspezies neutralisiert (Stewart *et al.*, 1999). Durch Verwendung von Na-Thiosulfat kann nachgewiesen werden, ob die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies Einfluss hat auf den gegebenen physiologischen Prozess (Wang *et al.*, 2002). Für die Durchführung des Tropftests (*Spot assay*) wurden jeweils 7  $\mu\text{l}$  Flüssigkultur des Wildtyps, der  $\Delta ssaA$ - und 6S(+)-Mutante sowie der  $\Delta ssaA$ -C-Mutante mit einer Zelldichte von  $OD_{750nm} = 0,5$  sowie die daraus



erstellten Verdünnungen von  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  auf dem jeweiligen Agar-Festmedium aufgetragen. Für die Wachstumsanalyse wurde neben dem standardisierten Agar-Festmedium (0,75 % Agar, 1 x BG11-Medium) auch ein mit 0,3 % (w/v) Na-Thiosulfat und / oder mit 10 mM Glukose modifiziertes Agar-Festmedium verwendet.



**Abbildung 2.6. Tropftest zur Wachstumsanalyse von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta$ ssaA-,  $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Mutante auf Agar-Festmedium.** Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp (WT),  $\Delta$ ssaA-,  $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Zellen mit einer Zelldichte von  $OD_{750nm} = 0,5$  wurden in drei Schritten ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) mit 1 x BG11-Medium verdünnt und zu je 7  $\mu$ l auf Festmedium (0,75 % Agar, 1 x BG11-Medium) aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte für sieben Tage bei kontinuierlichen 30 °C und einer Belichtung von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Anzucht erfolgte unter photoautotrophen Bedingungen (A), in Gegenwart von 0,3 % Na-Thiosulfat (B), unter photoheterotrophen Bedingungen in Gegenwart von 10 mM Glukose (C) und in Gegenwart von 0,3 % Na-Thiosulfat und 10 mM Glukose (D).

Die Untersuchung des photoautotrophen Wachstums zeigt ein leichtes Defizit von  $\Delta$ ssaA gegenüber dem Wildtyp in der  $10^{-2}$ -Verdünnung. Zudem ist auffällig, dass alle Spots von  $\Delta$ ssaA eine leicht gelbliche Färbung aufwiesen (Abbildung 2.6 A). In Anwesenheit von Na-Thiosulfat zeigte  $\Delta$ ssaA ein verbessertes Wachstumsverhalten, auch bei geringer Zelldichte ( $10^{-2}$ -Verdünnung), mit einem minimalen Defizit gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 2.6 B). Keine Wachstumsdefizite wurden für die 6S(+)-Mutante unter photoautotrophen Bedingungen beobachtet. Photoheterotrophes Wachstum in Anwesenheit von Glukose führte zu einer deutlichen Verstärkung des physiologischen Defizits von  $\Delta$ ssaA gegenüber dem Wildtyp bei hohen Lichtintensitäten ( $10^{-1}$ -Verdünnung,  $10^{-2}$ -Verdünnung,  $10^{-3}$ -Verdünnung). Vermindertes Wachstum von  $\Delta$ ssaA war zudem bei einer Zelldichte von  $OD_{750nm} = 0,5$  zu beobachten (Abbildung 2.6 C). Na-Thiosulfat hatte einen leicht positiven Effekt auf das Wachstum von  $\Delta$ ssaA unter photoheterotrophen Bedingungen (Abbildung 2.6 D). Eine minimale Reduzierung des Wachstums unter photoheterotrophen Bedingungen konnte ebenfalls für die 6S(+)-Mutante bei der  $10^{-3}$ -Verdünnung festgestellt werden. Das Wachstumsverhalten der  $\Delta$ ssaA-C-Mutante, welche als

Kontrolle von  $\Delta ssaA$  eingesetzt wurde, glich unter allen getesteten Bedingungen dem des Wildtyps (Abbildung 2.6).

Abschließend kann festgehalten werden, dass es unter hohen Lichtintensitäten in  $\Delta ssaA$  zu einer phänotypischen Ausprägung kommt, welche in Gegenwart von Na-Thiosulfat abgeschwächt wird und die auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und somit auf oxidativen Stress zurückzuführen ist.

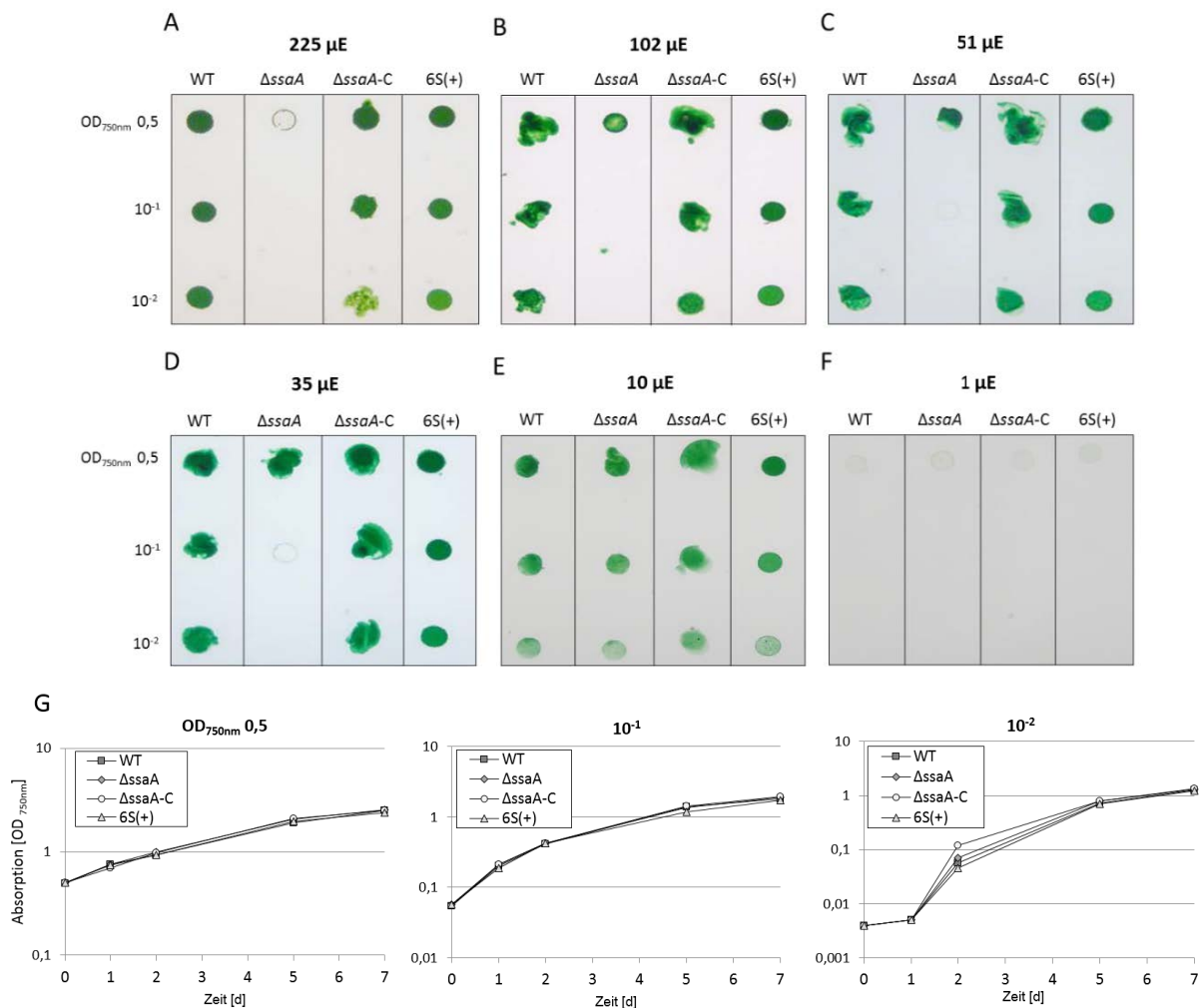
#### 2.2.5.1 Lichtsensitivität von $\Delta ssaA$ in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode

In ihrem natürlichen Habitat sind *Synechocystis*-Zellen sich ständig ändernden Lichtintensitäten ausgesetzt. Unter Laborbedingungen werden *Synechocystis*-Stämme üblicherweise bei einer Lichtintensität von 30 – 80  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert und erzielen dabei die höchste Wachstumsrate. Bei niedrigen Lichtintensitäten von unter 10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sowie bei Starklichtbedingungen von über 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ist die Wachstumsrate hingegen stark reduziert. Im Folgenden sollte zum einen analysiert werden, ob und bei welchen Lichtintensitäten die Ausprägung des in Abschnitt 2.2.5 gezeigten Lichtstress bedingten Phänotyps von  $\Delta ssaA$  aufgehoben werden kann. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die Kultivierung unter Starklichtbedingungen zu einer Verstärkung des Phänotyps führt. Darüber hinaus wurden vergleichende Wachstumsanalysen in Flüssigkultur durchgeführt. Alle in diesem Abschnitt gezeigten Wachstumsanalysen wurden ausschließlich unter photoautotrophen Bedingungen generiert.

Flüssigkulturen der unterschiedlichen Stämme (Wildtyp,  $\Delta ssaA$ ,  $\Delta ssaA$ -C und 6S(+)) wurden mit einer definierten Zelldichte ( $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5$ ) und zwei daraus erstellten Verdünnungen ( $10^{-1}$  und  $10^{-2}$ ) auf Agar-Festmedium (0,75 % Agar, 1 x BG11-Medium) aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte bei Starklicht (225  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 102  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Normallicht (51  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 35  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) für sieben Tage und bei Schwachlicht (10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 1  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) für 13 Tage bei jeweils 30 °C (Abbildung 2.7 A-F). Aus denselben Flüssigkulturen, mit einer Zelldichte von  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5$ ,  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5 \times 10^{-1}$  und  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5 \times 10^{-2}$ , wurden je 20 ml für eine parallel durchgeführte Wachstumsanalyse in Flüssigmedium verwendet (Abbildung 2.7 G). Für die hier gezeigte Analyse wurden Flüssigkulturen mit niedriger Zelldichte eingesetzt, die in flachen Zellkulturflaschen liegend inkubiert wurden, um eine gleichmäßige Belichtung der Zellen zu gewährleisten.

Aus dem Vergleich der Tropftests geht deutlicher hervor, dass die Zellviabilität der  $\Delta ssaA$ -Mutante mit steigender Lichtintensität abnahm (Abbildung 2.7 A-F). Unter dem Einfluss von Starklicht (225  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) war sogar in der  $\Delta ssaA$ -Probe mit der höchsten Zelldichte ( $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5$  zu Beginn des Experiments) ein stark vermindertes Wachstum zu notieren (Abbildung 2.7 A). Dagegen zeigten Wildtyp,  $\Delta ssaA$ -C und 6S(+) kaum Beeinträchtigungen im Wachstum bei gleicher Belichtung. Auch bei mittleren Lichtintensitäten (bei jeweils 102, 51 und 35  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) war ein deutliches Wachstumsdefizit von  $\Delta ssaA$  zu erkennen (Abbildung 2.7 B-D). Interessanterweise war der beschriebene Phänotyp von  $\Delta ssaA$  unter Schwachlicht nicht ausgeprägt. Bei einer Belichtung von 10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  konnte für alle vier Kulturen ein gleichmäßiges Wachstumsverhalten beobachtet werden (Abbildung 2.7 E). Bei minimaler Belichtung von 1  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wiesen

alle Kulturen ein einheitlich stark vermindertes Wachstum auf (Abbildung 2.7 F). Die Ergebnisse des Tropftests zeigen, dass die Lichtsensitivität der  $\Delta ssaA$ -Mutante in Korrelation zur Intensität des einfallenden Lichts steht. Bei Starklicht- und Normallichtbedingungen zeigte die Mutante ein deutliches Wachstumsdefizit. Die phänotypische Ausprägung wurde unter sehr hohen Lichtintensitäten weiter verstärkt. Dagegen wurden die physiologischen Defizite der Mutante bei Schwachlichtbedingungen aufgehoben.



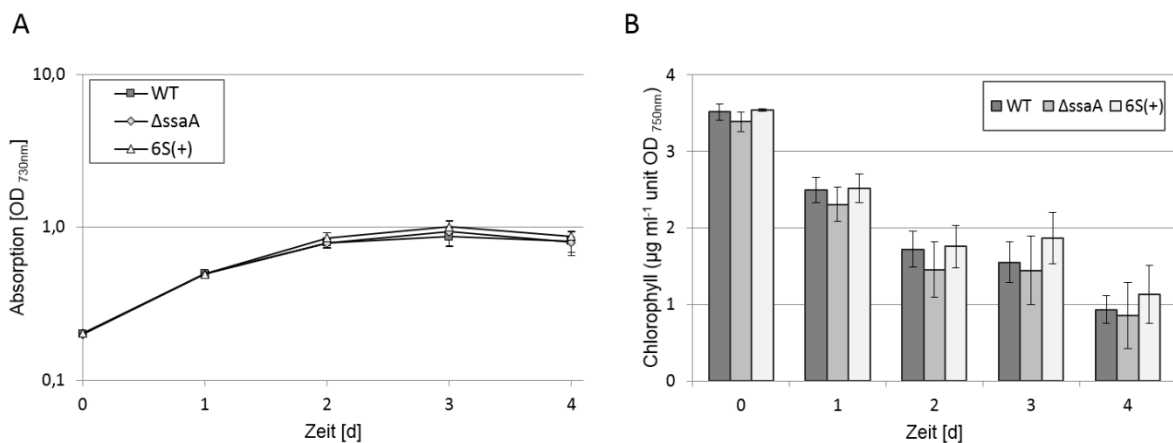
**Abbildung 2.7. Analyse der Lichtsensitivität von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta ssaA$ -,  $\Delta ssaA-C$ - und 6S(+)-Mutante in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode.** Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp (WT),  $\Delta ssaA$ -,  $\Delta ssaA-C$ - und 6S(+)-Zellen mit einer OD<sub>750nm</sub> = 0,5 wurden in zwei Schritten (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-10</sup>) mit 1 x BG11-Medium verdünnt und zu je 7  $\mu$ l auf Festmedium (0,75 % Agar, 1 x BG11-Medium) aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und konstanter Belichtung mit unterschiedlichen Lichtstärken für sieben Tage: Starklicht: **A**: 225  $\mu$ mol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ( $\mu E$ ) und **B**: 102  $\mu E$ ; Normallicht: **C**: 41  $\mu E$  und **D**: 35  $\mu E$ ; bzw. für 13 Tage bei Schwachlicht: **E**: 10  $\mu E$  und **F**: 1  $\mu E$ . Parallel dazu wurde das Wachstum der Flüssigkulturen von WT,  $\Delta ssaA$ -,  $\Delta ssaA-C$ - und 6S(+)-analysiert. Die Kulturen mit einer Zelldichte von OD<sub>750nm</sub> = 0,5 sowie den Verdünnungsstufen 10<sup>-1</sup> und 10<sup>-10</sup> wurden zu je 20 ml liegend in flachen Zellkulturgefäßen unter kontinuierlicher Rotation bei 30 °C und einer Lichtintensität von 51  $\mu E$  für sieben Tage inkubiert. Dargestellt sind die Messpunkte von je einer Flüssigkultur pro Stamm (**G**).

Bei einer parallel durchgeführten Wachstumsanalyse in Flüssigmedium, bei der Flüssigkulturen der vier Stämme bei unterschiedlichen Zelldichten unter Normallichtbedingungen ( $51 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert wurden, waren alle Stämme gleichmäßig gewachsen (Abbildung 2.7 G). Dies zeigt, dass die Ausprägung des Phänotyps von *ΔssaA* scheinbar nicht allein von der Lichtintensität, sondern auch von der verwendeten Kultivierungsmethode abhängig ist.

## 2.2.6 Einfluss von 6S RNA auf die Thermotoleranz bei der subletalen Temperatur von 40 °C

Abiotischer Stress in Form von hohen Temperaturen ist für mesophile Cyanobakterien ein limitierender Wachstumsfaktor. Um zu schauen, ob 6S RNA bei der Anpassung an Hitzestress in *Synechocystis* eine Rolle spielt, wurde im Folgenden die Thermotoleranz der *ΔssaA*-Mutante anhand ihres Wachstumsverhaltens bei hohen Temperaturen untersucht.

Da eine Kultivierung bei Temperaturen von über 40 °C aus technischen Gründen nicht durchführbar war, wurde die Thermotoleranz von *ΔssaA* und 6S(+) in dieser Arbeit durch Langzeitkultivierung bei der subletalen Temperatur von 40 °C untersucht (Fu & Xu, 2006; Tahara *et al.*, 2012). Dazu wurden jeweils 30 ml Flüssigkultur von *Synechocystis* Wildtyp, *ΔssaA* und 6S(+) unter konstanten Bedingungen bei einer Lichtintensität von  $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für vier Tage auf 40 °C temperiert. Die Wachstumsanalyse erfolgte alle 24 Stunden durch Messung der Optischen Dichte bei 750 nm (Abbildung 2.8 A).



**Abbildung 2.8. Thermotoleranz von *Synechocystis* Wildtyp, *ΔssaA*- und 6S(+)-Mutante.**

**A:** Wachstumsanalyse von Wildtyp (WT), *ΔssaA*- und 6S(+)-Zellen in Flüssigkulturen (30 ml). Zuvor wurden die Stämme unter Standardbedingungen bei 30 °C inkubiert. Die Zelldichte wurde zu Versuchsbeginn auf  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,2$  eingestellt. Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyerkolben unter konstanten Bedingungen bei 40 °C und Normallicht ( $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von sechs biologischen Replikaten. **B:** Chlorophyllgehalt von WT, *ΔssaA*- und 6S(+)-Zellen vor bzw. während der Kultivierung bei 40 °C. Der Chlorophyllgehalt wurde mit dem verwendeten Probenvolumen verrechnet und anschließend auf die  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  normiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei (Zeitpunkt 0) bzw. sechs biologischen Replikaten (Zeitpunkte 1, 2, 3 und 4 Tage (d)).

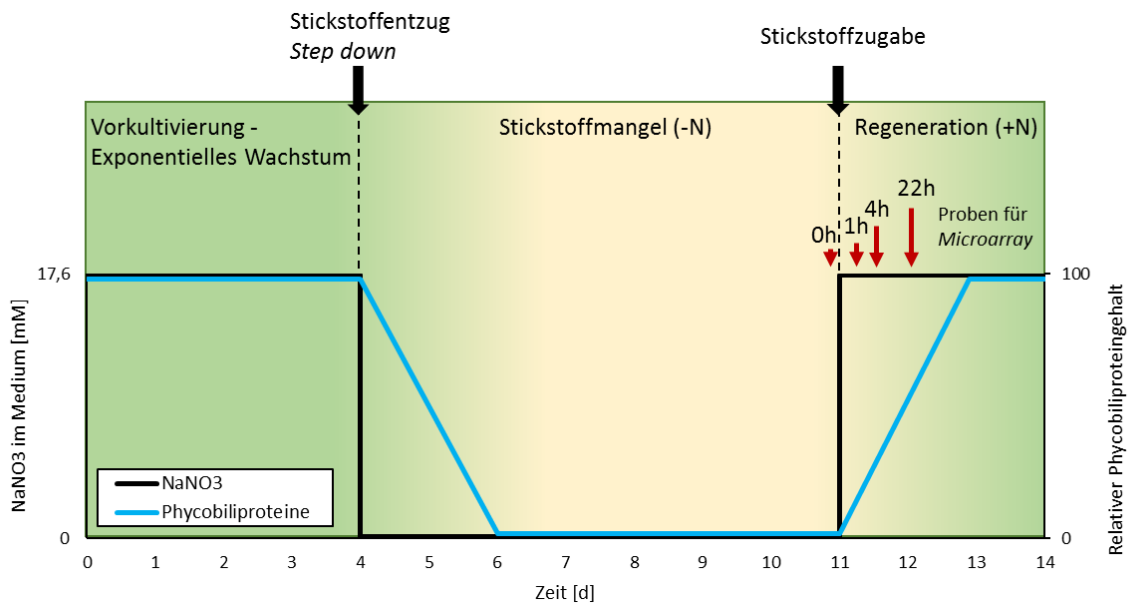
Darüber hinaus wurde zu denselben Zeitpunkten die Chlorophyllmenge der Zellkulturen bestimmt, um die Zusammensetzung der Pigmente zu analysieren (Abbildung 2.8 B). Die Chlorophyllmenge ist in Relation zur Zelldichte aufgetragen. Aus den ermittelten Daten geht hervor, dass alle getesteten Kulturen ein gleichmäßiges Wachstum zeigten, mit einem Maximum am dritten Tag ( $OD_{750nm} \approx 1,0$ ). Ab dem vierten Tag war ein Rückgang des Wachstums zu verzeichnen (Abbildung 2.8 A). Im Hinblick auf die Entwicklung der Chlorophyllkonzentration während des viertägigen Wachstums bei 40 °C war eine einheitliche Abnahme bei allen getesteten Zellkulturen zu erkennen (Abbildung 2.8 B). Die sowohl im Hinblick auf das Wachstumsverhalten als auch in Bezug auf den Chlorophyllgehalt leicht positiv abweichenden Werte der 6S(+)-Mutante unterschieden sich nur minimal von den Werten des Wildtyp-Stammes und repräsentieren keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass weder die Abwesenheit noch die Überexpression von 6S RNA eine Änderung im Wachstumsverhalten von *Synechocystis* bei der subletalen Temperatur von 40 °C bewirkt hat. Unter diesen Bedingungen scheint die 6S RNA keinen Einfluss auf die Thermotoleranz der Zellen zu haben.

### 2.2.7 Einfluss von 6S RNA auf die Stressantwort bei Stickstoffmangel und Regeneration

Cyanobakterien sind stetig wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt und haben daher zahlreiche Adaptationsmechanismen gegen Nährstoffmangel entwickelt. Als nicht-diazotrophes Cyanobakterium ist *Synechocystis* in der Lage bei Stickstoffmangel durch den Abbau der Phycobilisomen zelleigene Stickstoffreserven zu mobilisieren (Richaud *et al.*, 2001). Der durch den Pigmentabbau hervorgerufene Farbumschlag von blau-grün zu gelb wird als Chlorose bezeichnet und findet innerhalb der ersten 24 - 48 Stunden nach Stickstoffentzug aus dem Medium statt (Li & Sherman, 2002). Bei anhaltendem Stickstoffmangel gehen die Zellen nach dem Abbau der Phycobilisomen und Chlorophyll  $\alpha$  in einen Ruhezustand über, in dem ihr Stoffwechsel stark reduziert ist (am Beispiel von *Synechococcus* PCC 7942: Görl *et al.* (1998)). Da sich Zellteilung und Absterben dabei im Gleichgewicht halten und die Zelldichte konstant bleibt, kann dieser Zustand auch als stationäre Phase bezeichnet werden.

Im Folgenden wurde der Einfluss von 6S RNA auf den Adaptationsmechanismus an wechselnde Stickstoffverfügbarkeit untersucht. Neben der Anpassung an das Fehlen gebundenen Stickstoffs im Medium wurde auch die Regeneration nach Stickstoffmangel durch erneute Stickstoffzufuhr analysiert. Dazu wurden Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp und *AssaA* zunächst für vier Tage in Standard-BG11-Medium inkubiert. Der Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit stickstoff-freiem BG11-Medium (*Step down*) realisiert. Die Zellen wurden anschließend für vier bis sieben Tage unter Stickstoffmangelbedingungen kultiviert (-N). Anschließend wurde die Regeneration der Zellen durch Supplementierung der Flüssigkulturen mit 17,6 mM  $NaNO_3$  initiiert (+N). Die Regeneration der Zellen wurde über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen dokumentiert. Die Wachstumsbedingungen bei 30 °C und einer durchgängigen Belichtungsintensität von 40 - 80  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurden über die gesamte Versuchszeit konstant gehalten. Eine vereinfachte schematische Darstellung der analytischen Versuchsdurchführung zu Stickstoffmangel (-N) und Regeneration (+N) des *Synechocystis* Wildtyp-

Stammes und verschiedener 6S RNA-Mutanten ist in Abbildung 2.9 abgebildet. Die durchgeführten Untersuchungen umfassen: Messungen verschiedener physiologischer und photosynthetischer Parameter (Abschnitte 2.2.7.1), eine mittels DNA-Microarray durchgeführte vergleichende Transkriptomanalyse von  $\Delta ssaA$  und Wildtyp (Abschnitte 2.2.7.2), einer *in vivo*-Analyse der Rekrutierung von Sigmafaktoren (Gruppe 1 und 2) durch die RNAP (Abschnitt 2.2.7.3) sowie die Analyse des 6S RNA-Transkriptlevels (Abschnitt 2.2.7.4) und der Synthese von pRNAs (Abschnitt 2.2.7.5). Teile der nachfolgenden Ergebnisse sind in Heilmann *et al.* (2017) veröffentlicht.



**Abbildung 2.9. Schematische Darstellung der dreiphasigen Versuchsdurchführung zur Analyse des Einflusses von 6S RNA auf die Adaptation bei wechselnder Stickstoffverfügbarkeit: Vorkultivierung, Stickstoffmangel (-N) und Regeneration (+N).** **Vorkultivierung:** Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta ssaA$  wurden zunächst unter Standardbedingungen (30 °C, bei konstanter Belichtung mit 40 - 80  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Erlenmeyerkolben oder in Glasfermentoren für vier Tage inkubiert, bis sie eine  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  von ca. 1,0 erreicht haben. **Stickstoffmangel (-N):** Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit stickstofffreiem Medium auf eine Zelldichte von  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,5$  verdünnt und für vier bis sieben Tage unter Stickstoffmangelbedingungen kultiviert. **Regeneration (+N):** Durch Komplementierung der Stickstoff-reduzierten Zellen mit 17,6 mM  $\text{NaNO}_3$  wurde das Wiederanwachsen der Zellen initiiert. Proben zur Isolation von Gesamt-RNA wurden zu den Zeitpunkten  $t_1=0\text{h}$  (entspricht 7d -N),  $t_2=1\text{h}$ ,  $t_3=4\text{h}$  und  $t_4=22\text{h}$  nach Stickstoffzugabe (+N) gewonnen und für die Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarrays verwendet (Abschnitt 2.2.7.2). Der  $\text{NaNO}_3$ -Gehalt des Mediums (schwarze Linie) sowie der relative Phycobiliproteingehalt pro Zelle (blaue Linie) sind schematisch dargestellt. Der Farbumschlag der Zellen (Chlorose) unter Stickstoffmangelbedingungen ist ebenfalls illustriert.

Eine erste Durchführung der in Abbildung 2.9 dargestellten Versuchsreihe mit *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta ssaA$  zeigte ein gleichmäßiges Wachstumsverhalten beider Stämme bei der Anpassung an Stickstoffmangelbedingungen. Die nach Stickstoffzugabe initiierte Regeneration der Zellen vollzog sich jedoch deutlich langsamer beim  $\Delta ssaA$ -Stamm als beim Wildtyp. Mehrere Wiederholungen der gleichen Versuchsreihe zeigten anschließend gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der Anpassung der beiden Stämme an Stickstoffmangel: Für  $\Delta ssaA$  wurde im Vergleich zum Wildtyp sowohl eine verzögerte als auch eine beschleunigte Anpassung an Stickstoffmangelbedingungen beobachtet. Ein einheitlicher Trend war dabei nicht zu erkennen. Anders verhielt es sich bezüglich der verzögerten

Regeneration von *ΔssaA* nach Stickstoffmangel: Die phänotypische Ausprägung konnte mit jeder weiteren Versuchsdurchführung (Abbildung 2.9) reproduziert werden und ist in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

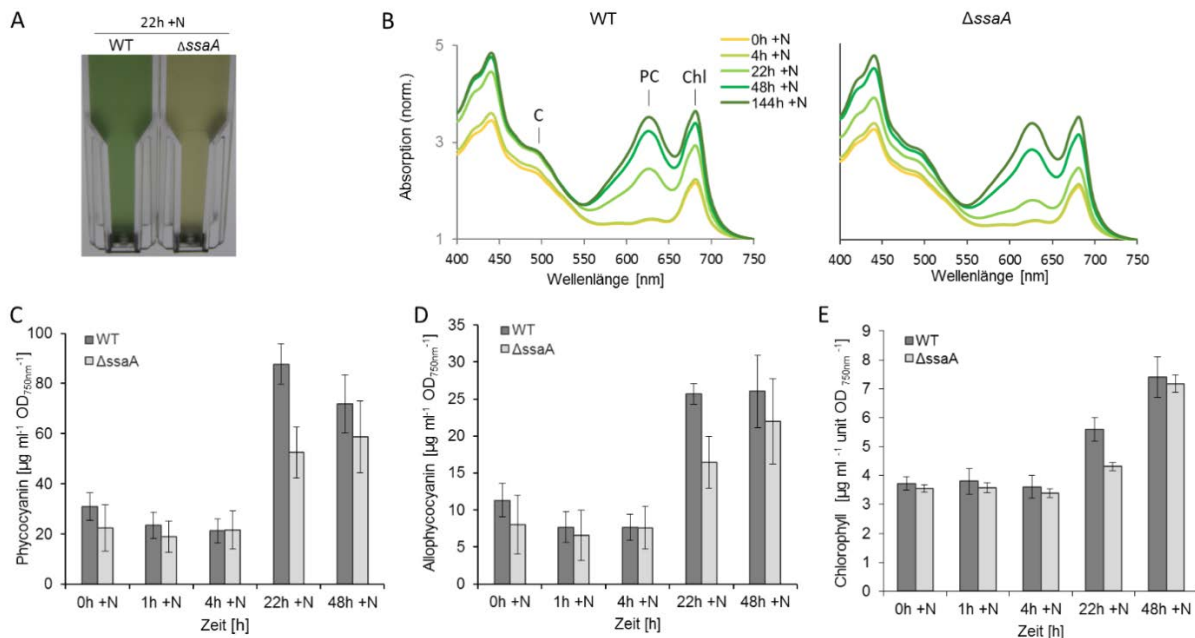
#### 2.2.7.1 Physiologische Charakterisierung der *ΔssaA*-Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und während der Regeneration (+N)

Um die phänotypische Ausprägung der 6S RNA-Deletion genauer zu untersuchen, wurden zunächst physiologische Parameter von *ΔssaA* und Wildtyp unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und während der Regeneration (+N) charakterisiert. Neben dem Gehalt der Photosynthese-Pigmente Phycocyanin, Allophycocyanin und Chlorophyll  $\alpha$  wurde die photosynthetische Aktivität sowie die Akkumulation und Degradation von Glykogen analysiert.

##### 2.2.7.1.1. Pigmentzusammensetzung

Die nach dem Entzug von gebundenem Stickstoff aus dem Medium auftretende und einleitend bereits erwähnte Chlorose ist auf den Abbau von Phycobiliproteinen zurückzuführen und ist meist mit bloßem Auge gut sichtbar. Dabei ist ein Farbumschlag von blau-grün zu gelb zu beobachten (Collier & Grossman, 1994). Der gelbe Farbton der Zellen bleibt auch über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis hin zu mehreren Wochen unter Stickstoffmangelbedingungen bestehen. Die Komplementierung des Mediums mit gebundenem Stickstoff führt zu einem erneuten Farbumschlag von gelb zu blau-grün und dem Wiederanwachsen der Zellen (Görl *et al.*, 1998). Die in Abbildung 2.10 A dargestellte photographische Aufnahme einer *Synechocystis* Wildtyp- und einer *ΔssaA*-Flüssigkultur zum Zeitpunkt 22h nach Stickstoffzugabe (+N) zeigt eine deutliche Gelbfärbung der Mutante, während der Wildtyp-Stamm bereits wieder blau-grün erscheint. Der Abbau der Phycobilisomen sowie die Verschiebung der Pigmentzusammensetzung konnte ferner spektrophotometrisch erfasst werden. Aus den Aufnahmen der spektralen Lichtabsorption bei Stickstoffmangel (0h +N) und während definierter Zeitpunkte der Regeneration (4h +N, 22h +N, 48h +N, 144h +N) geht hervor, dass die Reassemblierung der Phycobilisomen in der *ΔssaA*-Mutante verzögert ablief (Abbildung 2.10 B). Der größte Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigte sich zum Zeitpunkt 22h +N und ist an einem niedrigeren Phycobilisomen-*peak* bei einer Wellenlänge von ~ 620 - 630 nm in dem Absorptionsspektrum von *ΔssaA* deutlich zu erkennen. 144h nach Stickstoffzugabe zeigten beide Zellkulturen wieder eine einheitliche Absorption im Wellenlängenbereich der Phycobilisomen. Die Berechnung des Phycocyanin-Chlorophyll-Verhältnisses nach Myers *et al.* (1980) ergab für *ΔssaA* einen zum Zeitpunkt 22h +N um ~ 18 % und zum Zeitpunkt 48h +N um ~ 7,5 % verringerten Wert gegenüber dem Wildtyp. Zum Zeitpunkt 144h +N hatten sich die Werte der beiden Stämme wieder angeglichen. Genaue Werte zum Vergleich der zellulären Phycocyanin- und Allophycocyaninkonzentration von Wildtyp und *ΔssaA* sind in Abbildung 2.10 C und D dargestellt. Demnach war zum Zeitpunkt 22h +N sowohl der Phycocyanin- als auch der Allophycocyaningehalt in *ΔssaA* deutlich geringer. Die Konzentrationen wurde durch spektrophotometrisch Messung der löslichen Proteinfraction bei 620 nm bzw. 650 nm

nach der Formel von Tandeau de Marsac & Houmard (1988) ermittelt. Ein ähnlicher Trend konnte auch bei der mittels Methanol-Extraktion und spektrophotometrischer Messung bei 656 nm vorgenommenen Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll  $\alpha$  aus ganzen Zellen ermittelt werden (Abbildung 2.10 E). Unter Stickstoffmangelbedingungen (0h +N) und während der frühen Phase der Regeneration (1h +N und 4h +N) wurden für Wildtyp und  $\Delta ss aA$  fast identische Chlorophyll-Konzentrationen gemessen. 22h nach Stickstoffzugabe (+N) war die Chlorophyll-Konzentration von  $\Delta ss aA$  im Vergleich zum Wildtyp um  $\sim 22\%$  geringer. Bereits einen Tag später (Zeitpunkt 48h +N) hatte sich der Chlorophyll-Gehalt von  $\Delta ss aA$  dem des Wildtyps angeglichen. Da der Gesamt-Proteingehalt unter Stickstoffmangelbedingungen aufgrund der Degradation der Phycobilisomen stark abnimmt, wurde die Konzentration von Phycocyanin und Allophycocyanin sowie von Chlorophyll nicht wie üblich auf den Gesamt-Proteingehalt, sondern auf die Zelldichte bezogen. Jedoch war eine leichte Verzögerung von  $\Delta ss aA$  gegenüber dem Wildtyp auch im Hinblick auf das Wachstum und somit der Zelldichte zu erkennen, jedoch fiel diese vergleichsweise gering aus (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2.10. Vergleichende physiologische Charakterisierung von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta ss aA$ -Mutante unter Stickstoffmangel und Regeneration: Pigmentzusammensetzung.** **A:** Zellkulturen von Wildtyp (WT) und  $\Delta ss aA$  22h nach Stickstoffzugabe (22h +N). **B:** Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen von WT und  $\Delta ss aA$ , aufgenommen zu den Zeitpunkten 0h (vor Stickstoffzugabe) und 4h, 22h, 48h und 144h nach Stickstoffzugabe (+N). Die Spektren wurden auf die  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  normiert. **C:** Carotinoide; **PC:** Phycocyanin; **Chl:** Chlorophyll  $\alpha$  **C und D:** Konzentrationsbestimmung des Phycocyanin- und Allophycocyaningehalts zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 4h, 22h und 48h +N berechnet auf die  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  der Zellen. Zur Herstellung der löslichen Proteinfraction wurden jeweils 20 ml Zellkultur verwendet. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  der löslichen Proteinfraction zur spektrophotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 620 nm und 650 nm eingesetzt. Daraufhin wurde mit den im Abschnitt 4.2.4.4 aufgelisteten Formeln der Phycocyanin- und Allophycocyaningehalt berechnet **E:** Konzentrationsbestimmung des Chlorophyllgehalts der Zellen gemessen unter Stickstoffmangelbedingungen (0h +N) sowie 1h, 4h, 22h und 48h nach Stickstoffzugabe (+N), verrechnet mit der OD bei 750nm. Für die Messung wurde Chl  $\alpha$  aus jeweils 500  $\mu\text{l}$  Zellkultur mittels Methanol-Extraktion isoliert und bei einer Wellenlänge von 665 nm spektrophotometrisch vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von insgesamt drei biologischen Replikaten (C-E). Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

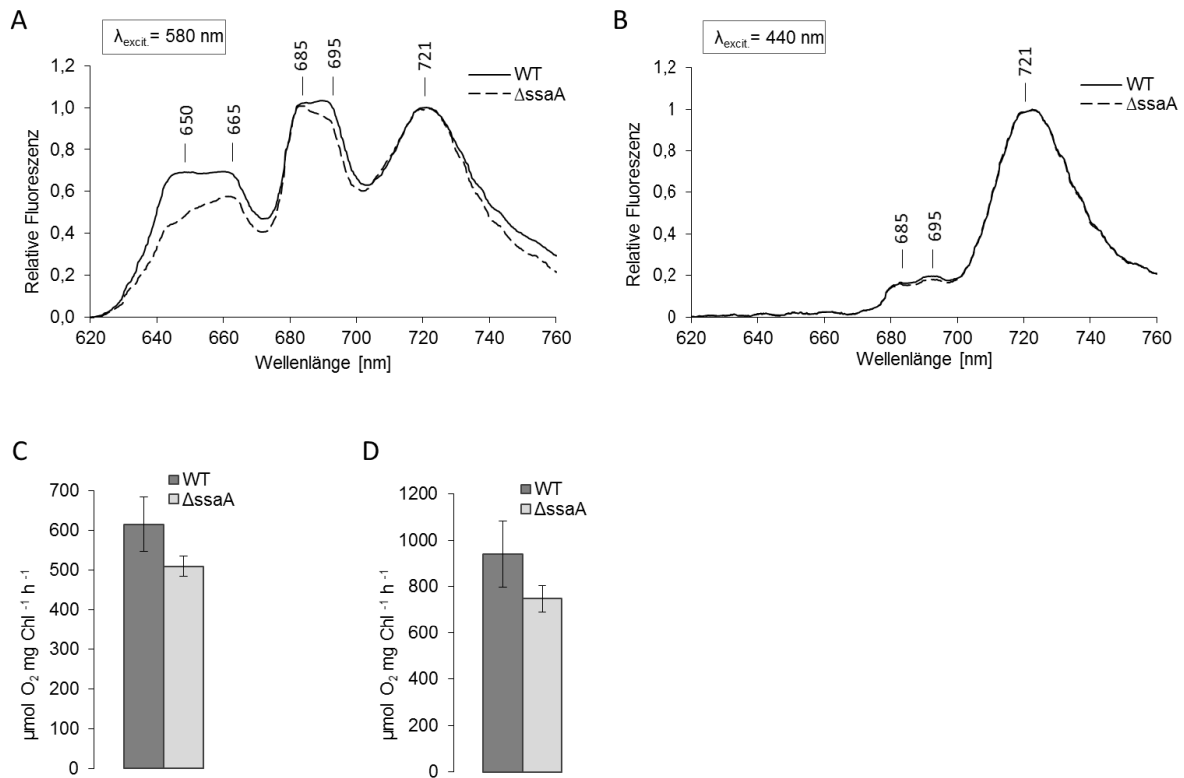


Zusammenfassend zeigt die Analyse der Pigmentzusammensetzung, dass der morphologische Phänotyp von  $\Delta ss a A$  während der Regeneration von Stickstoffmangel u. a. auf eine deutliche Verzögerung der Reassemblierung der Phycobilisomen und des Aufbaus von Chlorophyll zurückzuführen ist.

Zur Kontrolle der oben beschriebenen Ergebnisse wurde der gesamte Versuchsablauf (siehe Abbildung 2.9) mit der Komplementationsmutante  $\Delta ss a A-C$  wiederholt. Die Spektren zeigen, dass der für  $\Delta ss a A$  beobachtete Phänotyp in  $\Delta ss a A-C$  komplementiert wurde (Abbildung A.1 A). Die Reassemblierung der Phycobilisomen erfolgte in  $\Delta ss a A-C$  fast identisch zum Wildtyp. Demzufolge ist die beobachtete Verzögerung der Regeneration von Stickstoffmangel für  $\Delta ss a A$  spezifisch und deutet auf eine mögliche regulative Funktionsweise der 6S RNA bei der Stressantwort auf wechselnde Stickstoffverfügbarkeit hin. Analysen mit der 6S RNA-Überexpressionsmutante 6S(+) zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, dass ein höheres 6S RNA-Transkriptlevel keinen Einfluss auf die Regeneration nach Stickstoffmangel hat (Abbildung A.1 B).

#### 2.2.7.1.2. Photosynthetische Parameter

Unterschiede in der Stöchiometrie der photosynthetischen Komplexe lassen sich durch Messung der Fluoreszenzemission bei sehr niedrigen Temperaturen analysieren. Dafür wurden Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta ss a A$  zum Zeitpunkt 14h +N auf  $35 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  angereichert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Messung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte anschließend bei einer Temperatur von 77 K unter Anregung der Phycobilisomen mit Licht bei 580 nm (orangefarbenes Licht) oder von Chlorophyll bei 440 nm (blaues Licht). Die Spektren wurden bei beiden Anregungswellenlängen jeweils auf das bei einer Wellenlänge von  $\sim 721$  nm emittierende PSI (721 nm) normiert (Mullineaux & Allen, 1990). Dadurch konnten sowohl Unterschiede bei der Emission der Phycobilisomen als auch in der Stöchiometrie von PSI und PSII verdeutlicht werden. Unter Anregung der Phycobilisomen emittieren Phycocyanin und Allophycocyanin bei 650 nm und 665 nm (Thor *et al.*, 1998). Das Emissionsmaximum bei 685 nm lässt sich dem PSII-Antennenprotein CP43 (PsbC) und das bei 695 nm lässt sich dem PSII-Antennenprotein CP47 (PsbB) zuordnen (Wittmershaus *et al.*, 1992). Die in Abbildung 2.11 A dargestellten Aufnahmen von 77K-Fluoreszenzemissionsspektren der Phycobilisomenanregung zum Zeitpunkt 14h +N zeigen einen geringeren Phycocyanin- und Allophycocyaningehalt in  $\Delta ss a A$  und bestätigen die zuvor beschriebenen physiologischen Untersuchungen (Abbildung 2.10). Darüber hinaus konnte anhand der Spektren von  $\Delta ss a A$  sowohl unter Chlorophyll- als auch unter Phycobilisomenanregung ein verringertes Verhältnis des Emissionsmaximums von PSII CP47 (695 nm) zu CP43 (685 nm) ermittelt werden, welches eine reduzierte Effizienz des Elektronentransfers in PSII erklären könnte (Abbildung 2.11 A und B). Darüber hinaus konnten anhand der Spektren unter Chlorophyllanregung keine spezifischen Unterschiede der Stöchiometrie von PSII (695 nm) und PSI (721 nm) ermittelt werden (Abbildung 2.11 B).



**Abbildung 2.11. Photosynthetische Parameter von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta\text{ssaA}$ -Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration.** A und B: 77K-Fluoreszenzemissionsspektren zum Zeitpunkt 14h +N. Flüssigkulturen von Wildtyp (WT) und  $\Delta\text{ssaA}$ -Zellen wurden 14h nach Stickstoffzugabe (+N) geerntet, auf eine Chlorophyllkonzentration von  $35 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  angereichert, in  $50 \mu\text{l}$  Aliquote aufgeteilt und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Fluoreszenzemission der Phycobilisomenanregung wurde bei  $580 \text{ nm}$  (A) und die Anregung von Chlorophyll  $\alpha$  bei  $440 \text{ nm}$  (B) bei  $77 \text{ Kelvin}$  gemessen. Die Spektren wurden jeweils auf PSI ( $721 \text{ nm}$ ) normiert. C und D: *In vivo*-Sauerstoffentwicklung zum Zeitpunkt 16h +N. Jeweils  $1 \text{ ml}$  Flüssigkultur von WT und  $\Delta\text{ssaA}$ -Zellen wurde 16h nach Stickstoffzugabe (+N) für  $2 \text{ min}$  in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Sauerstoffentwicklung der Zellen unter Lichtsättigung ( $3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $10 \text{ mM NaHCO}_3$  bei  $32^\circ\text{C}$  gemessen (C). Die Aktivität von PSII zum Zeitpunkt 16h +N wurde ebenfalls unter lichtgesättigten Bedingungen ( $3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) in Gegenwart von  $1 \text{ mM DMBQ}$  und  $1 \text{ mM FeCy}$  durch Messung der Sauerstoffentwicklung bestimmt (D). Den dargestellten Mittelwerten und Standardabweichungen liegen Daten von drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei technischen Replikaten zugrunde (C und D). Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

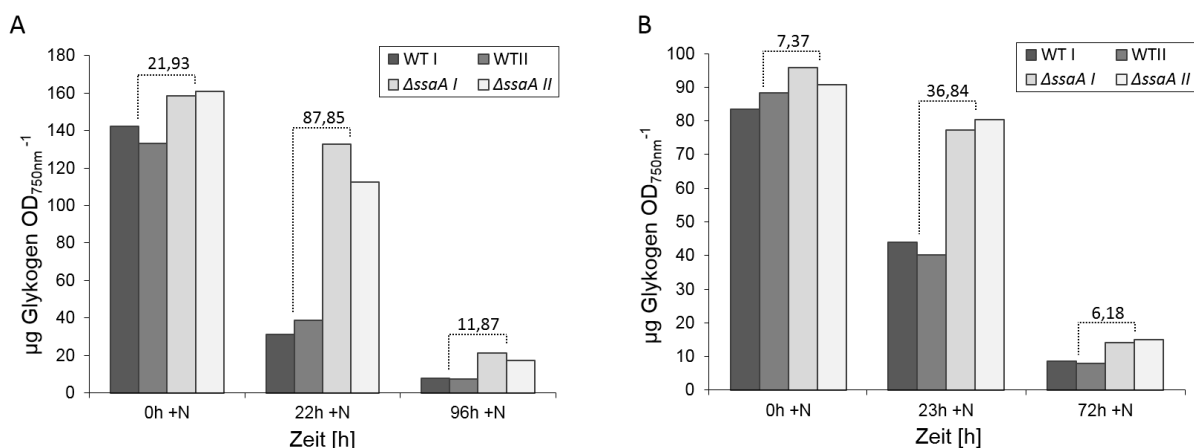
Das Mengenverhältnis der photosynthetischen Komplexe beeinflusst die photosynthetische Aktivität der Zellen. Daher wurde zusätzlich zum einen die Sauerstoffentwicklung der gesamten Elektronentransportkette (Photosyntheserate) und zum anderen die Sauerstoffentwicklung von PSII im Einzelnen ermittelt. Die Messung der Sauerstoffentwicklung erfolgte mit  $1 \text{ ml}$  einer Flüssigkultur von Wildtyp und  $\Delta\text{ssaA}$  zum Zeitpunkt 16h +N mit einer  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  von  $\sim 1$  *in vivo* in der Reaktionskammer einer Clark-Elektrode unter Lichtsättigung ( $3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bei  $32^\circ\text{C}$ . Die Photosyntheserate wurde in Anwesenheit von  $10 \text{ mM}$  Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) ermittelt. Für die Messung der PSII-Aktivität wurden die künstlichen Elektronenakzeptoren 2,6-Dimethoxy-1,4-bezoquinon (DMBQ) und Kaliumferricyanid (FeCy) verwendet. Die in Abbildung 2.11 C dargestellte Grafik zeigt, dass die Photosyntheserate in den  $\Delta\text{ssaA}$ -Zellen während der Regeneration nach Stickstoffmangel im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen deutlich um  $17,2 \%$  reduziert war. Für die PSII-

Aktivität wurde mit einer Reduktion von 20,55 % der Sauerstoffentwicklung der  $\Delta ssaA$ -Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen ein ähnlich hoher Wert ermittelt (Abbildung 2.11 D). Die gemessene Sauerstoffentwicklung wurde mit der Chlorophyllmenge verrechnet.

Die in Abbildung 2.11 beschriebenen Ergebnisse untermauern die in Abschnitt 2.2.7.1.1 gemachten Beobachtungen und zeigen, dass der chlorotische Phänotyp der  $\Delta ssaA$ -Mutante während der Regeneration mit einer verringerten Photosyntheserate der Zellen einherging.

### 2.2.7.1.3. Glykogenabbau

Neben der Veränderung der Pigmentzusammensetzung und der Reduktion der photosynthetischen Aktivität kommt es unter Stickstoffmangel in *Synechocystis*-Zellen zudem zu einer Akkumulation von Glykogen als Speicher für Kohlenstoff (Gründel *et al.*, 2012). Die Glykogengranula werden unter nährstoffkomplementierten Bedingungen wieder abgebaut. Um zu untersuchen, ob die verzögerte physiologische Regeneration von  $\Delta ssaA$  auch im Hinblick auf den Abbau von Glykogen zu beobachten ist, wurde der Glykogengehalt bestimmt (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12. Glykogengehalt von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta ssaA$ -Mutante unter Stickstoffmangel und Regeneration.** In zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (A und B) wurden Flüssigkulturen von Wildtyp (WT) und  $\Delta ssaA$ -Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (+N) bei konstanter Belichtung mit  $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  inkubiert. Jeweils 0,5 – 1,5 ml Zellkultur wurden zu den Zeitpunkten 0h (= 7d -N), 22h und 96h bzw. nach 0h, 23h und 72h nach Stickstoffzugabe (+N) für die Bestimmung des Glykogengehalts eingesetzt. Für die Bestimmung fand der durch Amyloglucosidase katalysierte enzymatische Abbau von Glykogen zu Glukose Anwendung. Der Glukosegehalt wurde anschließend von je zwei biologischen Replikaten (I und II) spektrophotometrisch bei einer Anregung von 340 nm bestimmt. Oberhalb der Säulen im Diagramm ist jeweils die mittlere Differenz angegeben. Die in A verwendeten Proben stammen aus dem Versuchsdurchlauf, aus dem ebenfalls die für die *Microarray*-Analyse entnommenen Proben stammen (Abschnitt 2.2.7.2). Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

Dafür wurden in zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen (Abbildung 2.12 A und B) 0,5 – 1,5 ml von Wildtyp und  $\Delta ssaA$ -Flüssigkulturen zu den angegebenen Zeitpunkten unter Stickstoffmangel sowie nach Stickstoffzugabe für den durch Amyloglucosidase katalysierten enzymatischen Abbau von Glykogen zu Glukose eingesetzt. Die Glukosemenge wurde anschließend mithilfe der Hexokinase-

Methode enzymatisch bestimmt (Farrance, 1987; Gründel *et al.*, 2012). Wie in Abbildung 2.12 dargestellt ist, verfügte *ΔssaA* im Gegensatz zum Wildtyp unter Stickstoffmangel (0h +N) über einen leicht höheren Glykogengehalt. 22h bzw. 23h nach Stickstoffzugabe war eine deutliche Reduktion des Glykogengehalts im Wildtyp zu beobachten, während für die 6S RNA-defizienten Zellen hingegen nur ein leichter Rückgang ermittelt wurde. Messungen zum Zeitpunkt 96h bzw. 72h nach Stickstoffzugabe zeigen, dass sich der Glykogengehalt in *ΔssaA* wieder dem Level in Wildtyp-Zellen angenähert hat.

Die Daten zum Glykogengehalt (Abbildung 2.12) verdeutlichen, dass die Deletion des *ssaA*-Gens einen inhibierenden Effekt auf den Glykogenabbau hat. Demnach erfolgte nicht nur die Reassemblierung der Phycobilisomen und der Aufbau von Chlorophyll, sondern auch der Abbau des Speicherstoffs Glykogen in Abwesenheit von 6S RNA zeitlich verzögert.

Zusammenfassend liefern die in den Abschnitten 2.2.7.1.1 bis 2.2.7.1.3 gezeigten Daten einen Hinweis darauf, dass die 6S RNA in *Synechocystis* eine wichtige Funktion in der Regulation der Initiation der physiologischen Zellantwort bei der Regeneration nach Stickstoffstress übernimmt.

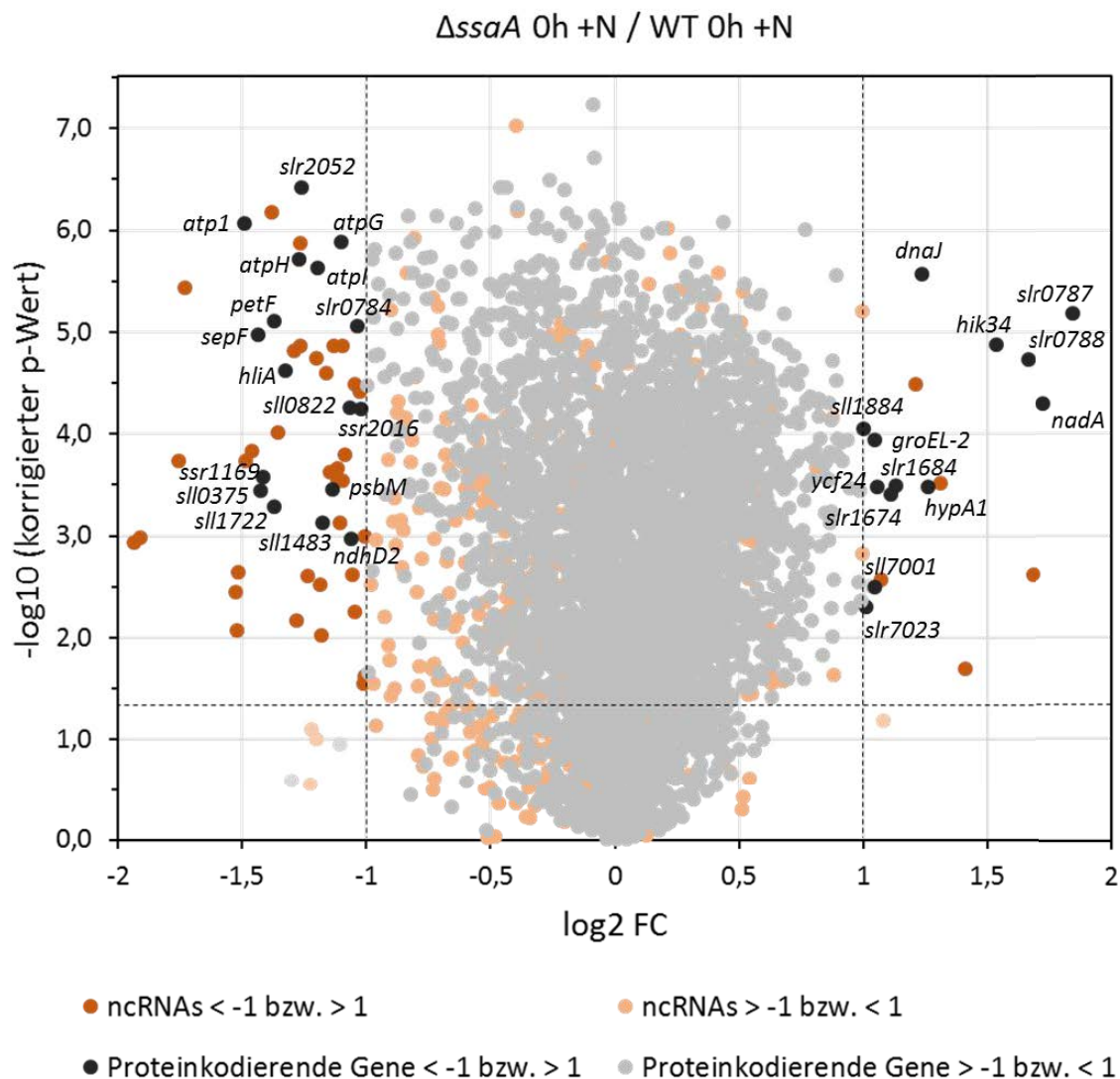
#### 2.2.7.2 Vergleichende *Microarray*-Analyse von Wildtyp und *ΔssaA* unter Stickstoffmangel und während der Regeneration

Um den molekularen Hintergrund des morphologischen Phänotyps von *ΔssaA* während der Regeneration nach Stickstoffmangel zu untersuchen, wurde eine vergleichende DNA-*Microarray*-Analyse vorgenommen. Dafür wurden jeweils zwei Flüssigkulturen des *ΔssaA*- und des Wildtyp-Stammes wie in Abbildung 2.9 beschrieben zunächst für sieben Tage unter Stickstoffmangelbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die erste Probe zur Transkriptom-Analyse entnommen. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Stickstoff zugegeben worden war, wird der Zeitpunkt als 0h +N bezeichnet. Nach der ersten Probennahme wurde die Regeneration der Zellen durch Komplementierung mit Stickstoff (17,6 mM NaNO<sub>3</sub>) ausgelöst. Während der Regenerationsphase wurden zu den Zeitpunkten 1h, 4h und 22h +N weitere Proben entnommen. Für die nachfolgende Transkriptom-Analyse wurde aus den Zellen Gesamt-RNA extrahiert und diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Anschließend folgte die Hybridisierung des *Microarray* nach Georg *et al.* (2009). Bei dem *Array* handelt es sich um einen Gesamt-Genom-Genexpressions-*Array* des Organismus *Synechocystis*, der alle, aus einem *Tiling array* (Georg *et al.*, 2009) und *dRNA-Seq*-Transkriptomanalysen (Mitschke *et al.*, 2011a) gewonnenen Annotationen enthält (Heilmann *et al.*, 2017). Die *Microarray*-Analyse, inklusive der Fluoreszenzfärbung der Proben sowie die Durchführung der Hybridisierung, erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hess (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg). Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mithilfe des R Skripts 'limma' (Ritchie *et al.*, 2015). Zur Hintergrundkorrektur des Medians wurde die 'normexp'-Funktion verwendet und anschließend wurde eine Quantil-Normalisierung vorgenommen. Die statistische Auswertung und Normalisierung der Rohdaten erfolgte durch Herrn Dr. Jens Georg (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg). Die hier abgebildeten Analysen wurden auf Grundlage der normierten Daten erstellt.

Zunächst wurde analysiert, welche Gene in *ΔssaA* im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum unter Stickstoffmangel (0h +N) differentiell reguliert sind. Dadurch konnte untersucht werden, ob sich die beiden Stämme bereits vor Beginn der Regeneration von Stickstoffmangel auf Transkriptom-Ebene unterscheiden. Anschließend wurde auf dieser Grundlage die vergleichende Transkriptomanalyse von *ΔssaA* und Wildtyp für die Regenerationszeitpunkte 1h, 4h und 22h nach Stickstoffzugabe (+N) vorgenommen.

#### 2.2.7.2.1 Analyse differentiell exprimierter Gene unter Stickstoffmangelbedingungen (0h +N)

Um zu untersuchen, ob Expressionsunterschiede in 6S RNA-defizienten Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen vorkommen, wurden die Transkripte berücksichtigt, deren Genexpression in *ΔssaA* im Vergleich zum Wildtyp um das Zweifache hoch- oder runterreguliert war. Dies entspricht einem  $\log_2$  FC von  $\geq 1$  bzw.  $\leq -1$ . Zusätzlich sollten die Messwerte einen p-Wert von  $\leq 0,05$  aufweisen (entspricht einem korrigierten p-Wert von  $\leq 1,3$ ), um als signifikant differentiell exprimiert angesehen zu werden. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurde für 30 proteinkodierende Gene eine veränderte Transkriptmenge in *ΔssaA* nach Wachstum für sieben Tage in stickstofffreiem Medium nachgewiesen. Demnach wiesen weniger als 1 % der proteinkodierenden Gene in *ΔssaA* eine veränderte Transkriptakkumulation auf. Von den 30 differentiell exprimierten Genen war für 17 Gene eine Akkumulation und für 13 Gene eine Abnahme der Transkriptmenge zu beobachten (Abbildung 2.13). Eine Zunahme der Transkriptakkumulation konnte u. a. für Gene, die für die Quinolinatsynthese (*nadA*), die Chaperone DnaJ und GroEL2 sowie für die Histidinkinase (*hik34*) kodieren, ermittelt werden. Die in Abwesenheit von 6S RNA negativ regulierten Gene beinhalten u. a. Untereinheiten der ATP-Synthase (*atp1*, *atpH*, *atpG*, *atpI*), das für Ferredoxin I kodierende Gen *petF*, das stressinduzierte Peptidhomolog *ssr1169*, das Zellteilungsprotein *sepF*, die NADH Dehydrogenase Untereinheit 4 (*ndhD2*), das Starklicht-induzierte *hliA* sowie das Protein M des PSII-Reaktionszentrums (*psbM*). Neben den proteinkodierenden Genen war in 6S RNA-defizienten Zellen zudem die Transkription von sRNAs differentiell reguliert, wobei die meisten ncRNA-Transkripte runterreguliert waren. Für 33 asRNA-Transkripte war eine signifikante Abnahme zu verzeichnen, während 5 asRNAs hochreguliert waren. Zur besseren Darstellung wurde in dem *Volcano plot* der jeweilige Quotient der Transkriptmengen ( $\log_2$  FC) gegen den Signifikanzwert ( $-\log_{10}$  des korrigierten p-Wertes) aufgetragen (Abbildung 2.13).



**Abbildung 2.13. Analyse der Expressionsunterschiede in Wildtyp und  $\Delta$ ssaA nach siebentägiger Kultivierung unter stickstofffreien Bedingungen (0h +N).** Abgebildet sind die Differenzen (Log2 FC) aller proteinkodierender Transkripte und ncRNAs in  $\Delta$ ssaA im Vergleich zum Wildtyp (WT). Signifikant unterschiedliche Expressionswerte, die einen Log2 FC von  $\geq 1$  bzw.  $\leq -1$  (schwarz gestrichelte, senkrecht verlaufende Linien) sowie einen korrigierten p-Wert von  $\leq 0,05$  aufweisen, sind farblich hervorgehoben (schwarz: proteinkodierende Transkripte; orange: ncRNAs/sRNAs). Die Werte der proteinkodierenden Transkripte sind den jeweiligen Gennamen zugeordnet. Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

Insgesamt zeigt die Analyse, dass in 6S RNA-defizienten Zellen nach sieben Tagen Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen nur wenige Gene differentiell exprimiert waren. Somit unterschieden sich die Transkriptome der beiden Stämme (Wildtyp und  $\Delta$ ssaA) zum Zeitpunkt 0h +N nur minimal voneinander.

#### 2.2.7.2.2 Analyse differentiell exprimierter Gene während der Regeneration

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Genexpression in 6S RNA-defizienten Zellen während der Regeneration nach siebentägigem Stickstoffmangel im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unterscheidet,

wurden die Transkriptmengen 1h, 4h und 22h nach Stickstoffkomplementierung in Relation zu den Transkriptmengen zum Zeitpunkt 0h +N berechnet (Heilmann *et al.*, 2017). Als differentiell exprimiert wurden jene Gene angesehen, deren Transkriptmengen sich in *ΔssaA* im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt bzw. halbiert haben ( $\log_2$  *Foldchange* von  $\geq 1$  bzw.  $\leq -1$ , p-Wert  $\leq 0,05$ ). Sie sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Die vergleichende *Microarray*-Analyse zeigt, dass während der frühen Regenerationsphase (1h +N) in 6S RNA-defizienten Zellen 99 Transkripte signifikant negativ und 37 Transkripte signifikant positiv reguliert waren. Das macht bei insgesamt 5917 analysierten Transkripten 1,67 %, bzw. 0,63 % aus. Somit waren zu der frühen Regenerationsphase in Abwesenheit von 6S RNA nur wenige Gene differentiell exprimiert. Im Verlauf der Regeneration kam es zu einer leichten Zunahme der Expressionsunterschiede. 4h nach Stickstoffzugabe waren in *ΔssaA* 3,55 % der analysierten Transkripte runter- und 1,39 % hochreguliert. Zum Zeitpunkt 22h +N kam es zu einer weiteren Zunahme der positiv regulierten Transkripte (5,95 %) bei 3,04 % negativ regulierten Transkripten. Die Mehrheit der differentiell exprimierten Transkripte setzte sich aus nicht-kodierenden Transkripten von ncRNAs und asRNAs zusammen, wobei ncRNAs mehrheitlich negativ reguliert waren und asRNAs je nach Zeitpunkt gleichmäßig (1h +N), mehrheitlich negativ (4h +N) oder mehrheitlich positiv (22h +N) reguliert waren. Unter den differentiell regulierten ncRNAs sind fünf Transkripte, die als hypothetische Riboregulatoren mittels *dRNA-Seq*-Analysen sequenziert wurden, u. a. die sRNA SyR11 (Mitschke *et al.*, 2011a). Anhand der Transkriptomdaten wird außerdem ersichtlich, dass bestimmte Gencluster funktioneller Gruppen in *ΔssaA* einheitlich positiv oder negativ reguliert wurden. Während der frühen Regenerationsphase (1h und 4h +N) waren Gene kodierend für die ATP-Synthase sowie für Hauptbestandteile des Photosyntheseapparats (PSI, PSII und Phycobilisomen) runterreguliert, wohingegen zum Zeitpunkt 22h +N mehrere Gene der NADH-Dehydrogenase negativ reguliert waren. Eine auffällige Transkriptakkumulation war 22h nach Stickstoffzugabe für mehr als 40 ribosomale mRNAs zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt waren auch verstärkt hypothetische Transposasen, Transport- und Bindeproteine sowie Chaperone hochreguliert. Einige der regulierten Gencluster liegen z. T. als Operon vor, darunter fallen Gene der ATP-Synthase (*atp*), Allophycocyanin (*apc*) und Phycocyanin (*cpc*) der Phycobilisomen und die ribosomalen Proteine (*rps* und *rpl*) (Abbildung A.2). Neben den erwähnten Genclustern waren zudem weitere einzelne Gene differentiell exprimiert. Runterreguliert waren in *ΔssaA* u. a. Transkripte des Ferredoxin-Elektronentransporters (*petF* (*ssl0020*), 1h +N), der Fructose-Bisphosphat Aldolase (*fbaA* (*sll0018*), 1h +N), der großen Untereinheit von RuBisCo (*rbcl* (*slr0009*), 1h und 4h +N), die Ferredoxin-Nitritreduktase (*narB* (*sll1454*), 4h +N) und des NAD(P)H-Dehydrogenase-Transkriptionsregulators (*ndhR* (*sll1594*), 22h +N). Zu den einzelnen positiv regulierten Transkripten zählen u. a. *hik34* (*slr1285*, 1h+N und 4h +N) und *hypA* (*slr1675*, 4h +N, 22h +N), die bereits zum Zeitpunkt 0h +N positiv reguliert waren, das Hitzeschockprotein HtpG (*sll0430*, 4h +N), die für die phototaktische Motilität notwendigen Peptide Pila1 (*sll1694*, 4h +N und 22h +N) und Pila2 (*sll1695*, 4h +N) sowie die Exonuklease RecJ (*sll1354*, 22h +N), das durch Starklicht-induzierbare Polypeptid HliC (*ssl1633*, 22h +N), sowie das Eisenstress-induzierbare Chlorophyllbindeprotein IsiA (*sll0247*, 22h +N). Der zur Sigmafaktorgruppe 3 zugehörige ECF-Sigmafaktor SigG (*slr1545*) war in Abwesenheit von 6S RNA sowohl während der frühen Regenerationsphase als auch 22h nach Stickstoffzugabe

runterreguliert. Er ist der einzige Sigmafaktor, der bei der Auswahl des Schwellenwertes von  $\geq 1$  bzw.  $\leq -1$  bei einem Log2 FC differentiell exprimiert war (siehe auch Abschnitt 2.2.7.2.4).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Transkription wachstumsrelevanter Gene, die für die ATP-Synthase, PSI, PSII, Phycobilisomen und ribosomale Proteine kodieren, in Abwesenheit von 6S RNA während der Regeneration verzögert stattfand. Demnach ist die zuvor auf physiologischer Ebene beobachtete verlangsamte Regeneration von *ΔssaA* auch auf Ebene der Transkription nachweisbar.

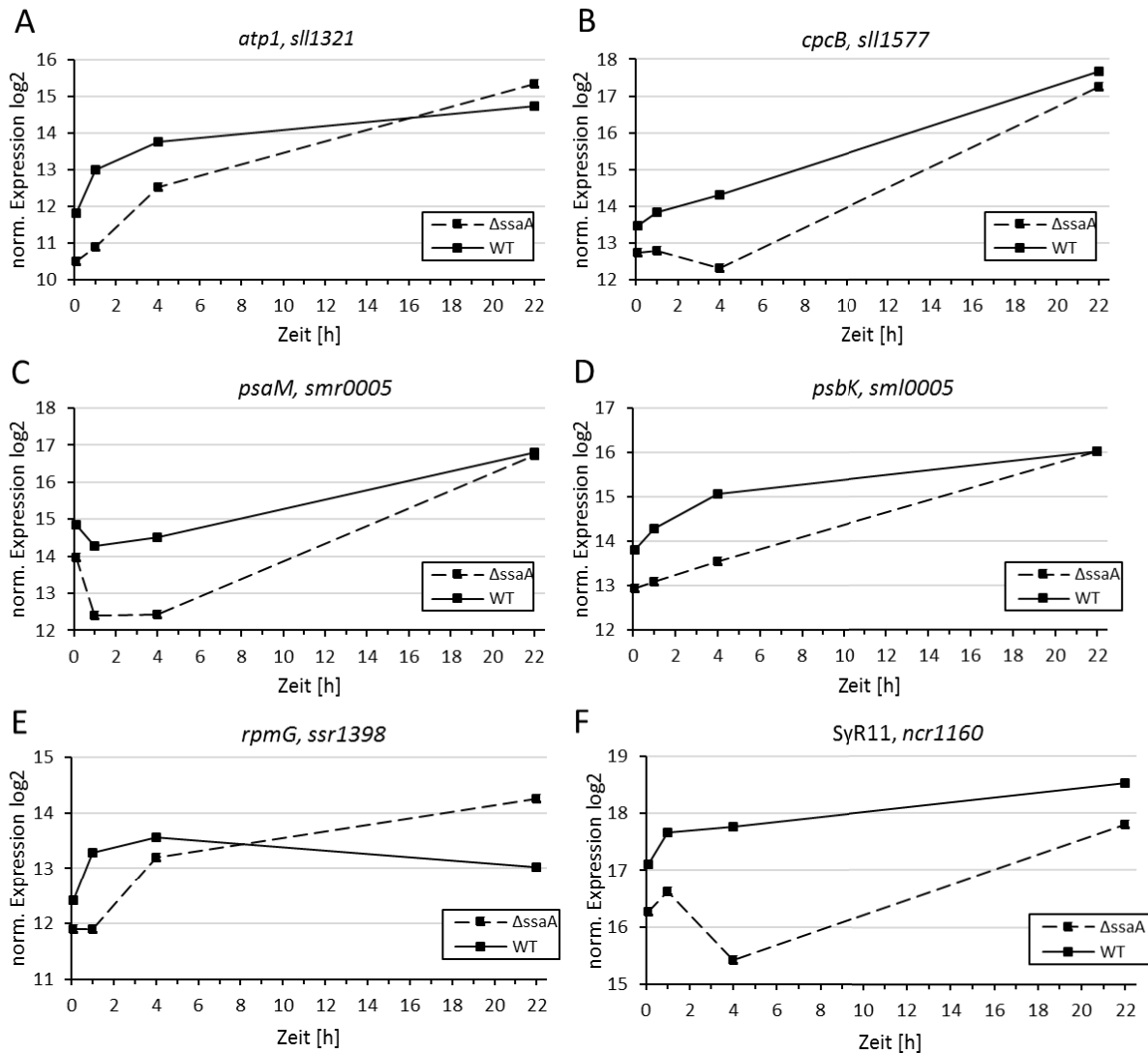
**Tabelle 2.1. Negativ und positiv regulierte Transkripte in *ΔssaA* während der Regeneration.** Auflistung funktioneller Gruppen von Genen, die in *ΔssaA* während der Regeneration nach Stickstoffmangel zu den Zeitpunkten 1h, 4h und 22h +N im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert sind. Die Transkriptmengen zu den Zeitpunkten 1h, 4h und 22h +N wurden gegen die Transkriptmengen zum Zeitpunkt 0h +N berechnet. Berücksichtigt wurden Transkripte mit einem Expressionsunterschied von Log2 FC von  $\geq 1$  bzw.  $\leq -1$  (p-Wert  $\leq 0,05$ ). Namentlich erwähnt sind jeweils die fünf Gene, für welche die größte Expressionsdifferenz ermittelt wurde, bzw. ausgewählte Transkripte (u. a. SyR11, IsrR). Gene, die keiner der aufgeführten Kategorien zugeordnet werden konnten, wurden in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.



Negativ regulierte Transkripte			Positiv regulierte Transkripte		
Transkript Kategorie	Anzahl	Gennamen/Proteinennamen	Transkript Kategorie	Anzahl	Gennamen/Proteinennamen
<b>1h +N</b>	<b>99</b>		<b>1h +N</b>	<b>37</b>	
ncRNAs	33	u.a. SyR11	ncRNAs	5	-
asRNAs	23	-	asRNAs	23	-
ATP-Synthase	8	u.a. <i>atpH</i> ( <i>ssl2615</i> ), <i>atpI</i> ( <i>sll1322</i> ), <i>atp1</i> ( <i>sll1321</i> ), <i>atpG</i> ( <i>sll1323</i> ), <i>atpC</i> ( <i>sll1327</i> )	Hypothetische Proteine	4	-
Ribosomale Proteine /Translation	4	<i>rpl33</i> ( <i>ssr1398</i> ), <i>rps18</i> ( <i>ssr1399</i> ), <i>rpl25</i> ( <i>sll1824</i> ), <i>cyp</i> ( <i>slr1251</i> )	Hypoth. Transposase	3	<i>slr1684</i> , <i>ssl0172</i> , <i>sll7001</i>
Transkription	1	<i>sigG</i> ( <i>slr1545</i> )	Chaperone	1	<i>DnaJ</i> ( <i>slr0093</i> )
Phycobilisom-assozierte Proteine	4	<i>apcB</i> ( <i>slr1986</i> ), <i>apcC</i> ( <i>ssr3383</i> ), <i>cpcA</i> ( <i>sll1578</i> ), <i>cpcB</i> ( <i>sll1577</i> )	Anderer	1	<i>hik34</i> ( <i>slr1285</i> )
Photosynthese	8	u.a. <i>psaM</i> ( <i>smr0005</i> ), <i>psbK</i> ( <i>sml0005</i> ), <i>psbI</i> ( <i>sml0001</i> ), <i>psaD</i> ( <i>slr0737</i> ), <i>psbE</i> ( <i>ssr3451</i> )	<b>4h +N</b>	<b>82</b>	
NADH Dehydrogenase	1	<i>ndhD2</i> ( <i>slr1291</i> )	ncRNAs	10	-
Hypothetische Proteine	11	-	asRNAs	43	-
Anderer	6	u.a. <i>fbpI</i> ( <i>slr2094</i> ), <i>petF</i> ( <i>ssl0020</i> ), <i>sll1784</i> , <i>rbcL</i> ( <i>slr0009</i> ), <i>fbaA</i> ( <i>sll0018</i> )	Ribosomale Proteine /Translation	1	<i>ctpB</i> ( <i>slr0257</i> )
<b>4h +N</b>	<b>210</b>		Hypothetische Proteine	17	-
ncRNAs	79	u.a. SyR11	Chaperone	4	<i>groEL-2</i> ( <i>sll0416</i> ), <i>DnaJ</i> ( <i>slr0093</i> ), <i>groES</i> ( <i>slr2075</i> ), <i>groEL1</i> ( <i>slr2076</i> )
asRNAs	87	u.a. LsrR	Anderer	7	u.a. <i>htpG</i> ( <i>sll0430</i> ), <i>piA1</i> ( <i>sll1694</i> ), <i>piA2</i> ( <i>sll1695</i> ), <i>hik34</i> ( <i>slr1285</i> ), <i>hypA1</i> ( <i>slr1675</i> )
ATP-Synthase	4	<i>atpH</i> ( <i>ssl2615</i> ), <i>atpI</i> ( <i>sll1322</i> ), <i>atp1</i> ( <i>sll1321</i> ), <i>atpC</i> ( <i>sll1327</i> )	<b>22h +N</b>	<b>352</b>	
Transkription	1	<i>sigG</i> ( <i>slr1545</i> )	ncRNAs	30	-
Phycobilisom-assozierte Proteine	9	u.a. <i>cpcA</i> ( <i>sll1578</i> ), <i>cpcB</i> ( <i>sll1577</i> ), <i>cpcC2</i> ( <i>sll1579</i> ), <i>apcF</i> ( <i>slr1459</i> ), <i>cpcD</i> ( <i>ssl3093</i> )	asRNAs	120	-
Photosynthese	10	u.a. <i>psaM</i> ( <i>smr0005</i> ), <i>psaD</i> ( <i>slr0737</i> ), <i>psbK</i> ( <i>sml0005</i> ), <i>psbZ</i> ( <i>sll1281</i> ), <i>psbM</i> ( <i>sml0003</i> )	Ribosomale Proteine /Translation	42	u.a. <i>rps14</i> ( <i>slr0628</i> ), <i>rpl19</i> ( <i>sll1740</i> ), <i>rpl35</i> ( <i>ssl1426</i> ), <i>rpl3</i> ( <i>sll1799</i> ), <i>glxX</i> ( <i>sll0179</i> )
Hypothetische Proteine	15	-	Transkription	2	<i>Rna</i> ( <i>slr1129</i> ), <i>rnpA</i> ( <i>slr1469</i> )
Anderer	5	<i>cbbL</i> ( <i>slr0009</i> ), <i>glpX</i> ( <i>slr2094</i> ), <i>sll1784</i> , <i>narB</i> ( <i>sll1454</i> ), <i>rfbB</i> ( <i>sll0575</i> )	Photosynthese	4	<i>petE</i> ( <i>sll0199</i> ), <i>slr1739</i> , <i>ssl3044</i> , <i>isiB</i> ( <i>sll0248</i> )
<b>22h +N</b>	<b>180</b>		Hypothetische Proteine	91	-
ncRNAs	53	-	Hypoth. Transposase	17	u.a. <i>sll1999</i> , <i>sll1985</i> , <i>sll0317</i> , <i>slr1246</i> , <i>sll7002</i>
asRNAs	64	-	Biosynthese von Cofaktoren	6	u.a. <i>folk</i> ( <i>slr1093</i> ), <i>gpx2</i> ( <i>slr1992</i> ), <i>moeB</i> ( <i>sll1536</i> ), <i>moaA</i> ( <i>slr0901</i> ), <i>hemK</i> ( <i>sll1237</i> )
Transkription	2	<i>sigG</i> ( <i>slr1545</i> ), <i>slr1859</i>	Transport- und Bindeproteine	8	u.a. <i>menF</i> ( <i>slr0817</i> ), <i>srrA</i> ( <i>slr1897</i> ), <i>zntC</i> ( <i>slr2043</i> ), <i>slr0639</i> , <i>sll1623</i>
Photosynthese	1	<i>petI</i> ( <i>sll1796</i> )	Chaperone	5	<i>groES</i> ( <i>slr2075</i> ), <i>DnaJ</i> ( <i>slr0093</i> ), <i>DnaK</i> ( <i>sll0170</i> ), <i>groEL1</i> ( <i>slr2076</i> ), <i>groEL-2</i> ( <i>sll0416</i> )
NADH Dehydrogenase	6	<i>ndhD3</i> ( <i>sll1733</i> ), <i>ndhF3</i> ( <i>sll1732</i> ), <i>ndhD5</i> ( <i>slr2007</i> ), <i>ndhD6</i> ( <i>slr2009</i> ), <i>ndhG</i> ( <i>sll0521</i> )	Anderer	26	u.a. <i>hypA1</i> ( <i>slr1675</i> ), <i>hik34</i> ( <i>slr1285</i> ), <i>piA1</i> ( <i>sll1694</i> ), <i>isiA</i> ( <i>sll0247</i> ), <i>hliC</i> ( <i>ssl1633</i> ), <i>recJ</i> ( <i>sll1354</i> )
Hypothetische Proteine	33	-			
Transport- und Bindeproteine	3	<i>sll0224</i> , <i>sll0834</i> , <i>aqpZ</i> ( <i>slr2057</i> )			
Anderer	18	u.a. <i>cupA</i> ( <i>sll1734</i> ), <i>ndhR</i> ( <i>sll1594</i> ), <i>sll1677</i> , <i>1678</i> , <i>nlpD</i> ( <i>slr0993</i> )			

## 2.2.7.2.3 Genexpressionsunterschiede ausgewählter Gene im zeitlichen Verlauf

Um einen besseren Überblick über den zeitlichen Verlauf der Transkript-Änderungen während der Regeneration zu bekommen, wurden einzelne Gene der zuvor beschriebenen funktionellen Gruppen ausgewählt und gesondert dargestellt (Abbildung 2.14).



**Abbildung 2.14. Zeitlicher Verlauf der Transkriptakkumulation ausgewählter Gene während der Regeneration nach Stickstoffmangel.** Dargestellt sind die normierten Expressionsdaten aus der vergleichenden *Microarray*-Analyse des *Synechocystis* WT-Stammes und der  $\Delta$ *ssaA*-Mutante gegen die Zeit (0h, 1h, 4h und 22h +N). Repräsentativ für die am stärksten regulierten Transkriptgruppen wurden die Gene (A) *atp1*, (B) *cpcB*, (C) *psaM*, (D) *psbK* und (E) *rpmG* ausgewählt. (F) zeigt den Verlauf der Transkriptakkumulation der in  $\Delta$ *ssaA* reprimierten sRNA SyR11. Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

Anhand der in Abbildung 2.14 A gezeigten Expressionsdaten wird ersichtlich, dass die Transkriptmenge des ATP-Synthase-Proteins I (*atp1*) im Wildtyp bereits 1h nach Stickstoffzugabe deutlich anstieg, während diese Zunahme in 6S RNA-defizienten Zellen erst nach 4h sichtbar wurde. Ähnlich verlief die Transkriptakkumulation des Proteins K des PSII-Reaktionszentrums (*psbK*) und des ribosomalen Proteins L33 (*rpmG*) in  $\Delta$ *ssaA* (Abbildung 2.14 D und E). Das für das Protein C der Phycocyanin- $\beta$ -Kette

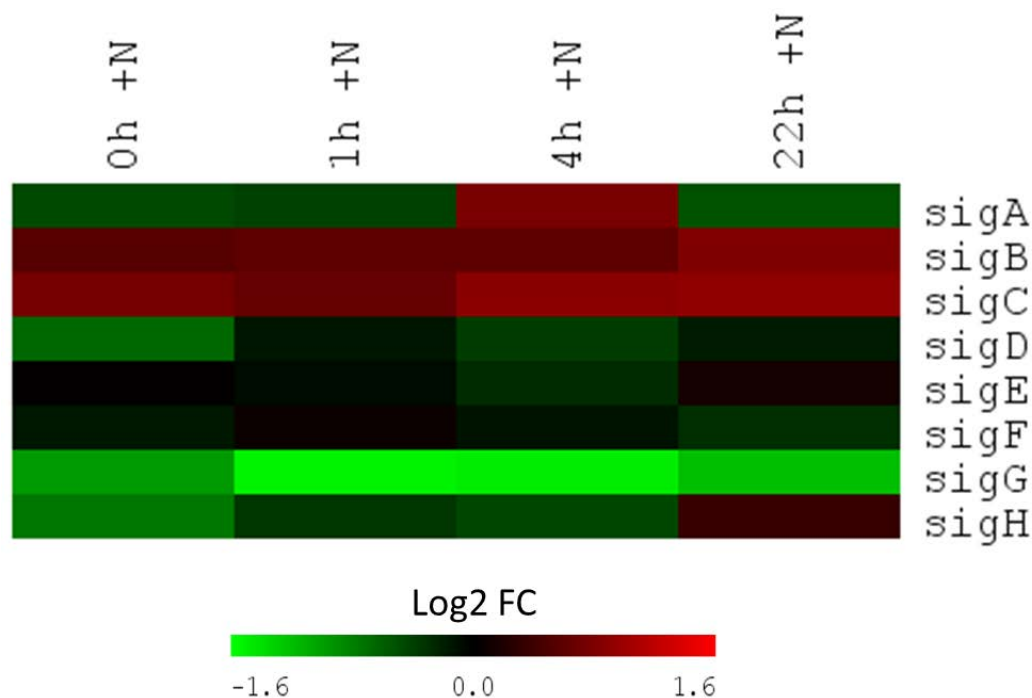
kodierende Gen *cpcB* wurde im Wildtyp während der Regeneration zunehmend verstärkt exprimiert, während in *ΔssaA* 4h nach Stickstoffzugabe ein Rückgang der Transkription gemessen wurde (Abbildung 2.14 B). In der frühen Phase der stickstoffinduzierten Antwort fand in beiden Stämmen eine Expressionsabnahme von *psaM* (Untereinheit 7 des PSI) statt, wobei die Abnahme in *ΔssaA* stärker ausfiel (Abbildung 2.15 C). 22h Stunden nach Stickstoffzugabe hatte sich die Expressionsrate für die meisten Transkripte in *ΔssaA* der des Wildtyps angeglichen bzw. überstieg diese deutlich, wie dies für *rpmG* zu beobachten war. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der ausgewählten Gene, dass es in *ΔssaA* unter Stickstoffmangelbedingungen zu einer leichten Reduktion der Expression der funktionellen Gruppen ATP-Synthase, Phycobilisomen, PSI, PSII und ribosomale Proteine kam sowie zu einer deutlichen Verzögerung der Expressionsinduktion nach Zugabe von Stickstoff.

Unter den differentiell exprimierten sRNAs wies die 90 nt lange SyR11 ein besonders auffälliges Expressionsprofil in *ΔssaA* auf. In Abwesenheit von 6S RNA war die Transkription der kleinen RNA zu allen Zeitpunkten runterreguliert, wobei es 4h nach Stickstoffzugabe zusätzlich zu einer signifikanten Abnahme der SyR11-Transkripte kam (Abbildung 2.14 F).

#### 2.2.7.2.4 Expressionsanalyse der Sigmafaktoren

Die 6S RNA spielt bei der Transkriptionsregulation in Prokaryoten eine wichtige Rolle und beeinflusst in *E. coli* den Wechsel von  $\sigma^{70}$ - zu  $\sigma^S$ -abhängiger Transkription, wodurch eine Anpassung an nährstofflimitierte Wachstumsbedingungen und Stressbedingungen ermöglicht wird (Trotochaud & Wassarman, 2004). Als nächster Schritt wurde daher auch für *Synechocystis* die Genexpression, der für die Sigmafaktoren kodierenden Gene in Abwesenheit von 6S RNA mithilfe der *Microarray*-Daten untersucht. Dazu wurden die Expressionsunterschiede der acht Gene *sigA* - *sigH* für *ΔssaA* im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 2.15). Bei Betrachtung der Expressionsunterschiede fällt zunächst auf, dass die Differenzen von *ΔssaA* und Wildtyp für die einzelnen Sigmafaktor-Gene sehr gering sind (Log2 FC von  $\leq 1$  bzw.  $\geq -1$ ). Lediglich für *sigG* konnten für die Zeitpunkte 1h, 4h und 22h +N signifikante Expressionsunterscheide (Log2 FC  $\leq -1$ ) ermittelt werden. Die Expression des für die Transkription der Haushaltsgene verantwortlichen Sigmafaktors SigA war in *ΔssaA* unter Stickstoffmangelbedingungen und während der frühen Regenerationsphase leicht runterreguliert (Log2 FC -0,46 (0h +N) und -0,41 (1h +N)), während zum Zeitpunkt 4h +N erhöhte *sigA*-Transkriptmengen gemessen wurden. Knapp einen Tag nach Stickstoffzugabe war die *sigA*-Expression in *ΔssaA* im Vergleich zum Wildtyp erneut runterreguliert (Abbildung 2.15). Bei Berücksichtigung der Rohdaten des Wildtyp-Stammes wird deutlich, dass *sigA* unter Stickstoffmangelbedingungen runterreguliert wurde. Bereits 1h nach Stickstoffzugabe kam es im Wildtyp zu einer deutlichen Transkriptakkumulation, die zu den Zeitpunkten 4h und 22h +N noch leicht zunahm (Heilmann *et al.*, 2017). Die Expression der Gruppe 2-Sigmafaktoren SigB und SigC war in Wildtyp-Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen hochreguliert, während es unter stickstoffkomplementierten Bedingungen zu einer Abnahme von *sigB*- und *sigC*-Transkripten kam (Heilmann *et al.*, 2017). Dieser Trend war auch für *ΔssaA* zu erkennen. Allerdings waren im Vergleich zum Wildtyp *sigB* und *sigC* sowohl unter Stickstoffmangelbedingungen als auch während der Regeneration hochreguliert

(Abbildung 2.15). Die Expression des Gruppe 2 Sigmafaktors SigD war in Abwesenheit von 6S RNA unter Stickstoffmangelbedingungen leicht runterreguliert, während nach Zugabe von Stickstoff nur minimale Expressionsunterschiede aufgetreten sind. Auch für *sigE* wurden nur geringe Expressionsunterschiede ermittelt (Abbildung 2.15). Dies ist überraschend, da die Expression des Gruppe 2-Sigmafaktors SigE von dem Stickstoffregulator NtcA gesteuert wird und unter Stickstoffmangelbedingungen hochreguliert ist (Krasikov *et al.*, 2012). Auch die Expression der Gruppe 3-Sigmafaktoren *sigF* und *sigH* verlief in den beiden Stämmen ähnlich, wobei *sigH* unter Stickstoffmangelbedingungen leicht runterreguliert war (Abbildung 2.15). Als einziger Sigmafaktor war SigG in  $\Delta$ *ssaA* sowohl unter Stickstoffmangelbedingungen als auch während der Regeneration signifikant runterreguliert (Abbildung 2.15). In Wildtyp-Zellen nahm die Expression von *sigG* unter Stickstoffmangelbedingungen zu, wohingegen es während der frühen Regenerationsphase zu einer Transkriptabnahme kam, die sich im späteren Verlauf abgeschwächt hat (Heilmann *et al.*, 2017).



**Abbildung 2.15. Genexpressionsprofil der acht Sigmafaktoren (SigA-SigH) in  $\Delta$ *ssaA* unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration.** Die Expressionsdifferenzen (Log2 FC) von  $\Delta$ *ssaA* im Vergleich zum Wildtyp zu den Zeitpunkten 0h +N (Stickstoffmangelbedingungen) und 1h, 4h und 22h +N (Regeneration nach Stickstoffmangel) sind für die Gene des Gruppe 1 Sigmafaktors SigA sowie für die Gene der Gruppe 2 Sigmafaktoren SigB, SigC, SigD, SigE und der Gruppe 3 Sigmafaktoren SigF, SigG, SigH als *Heatmap* dargestellt. Dabei wurden auch Transkripte berücksichtigt, deren Differenz  $\leq 1$  bzw.  $\geq -1$  (Log2 FC) ist. Rot: positiv regulierte Transkripte in  $\Delta$ *ssaA*; Grün: negativ regulierte Transkripte in  $\Delta$ *ssaA*. Die *Heatmap* wurde mithilfe des *Multiple Experiment Viewer* der Online-Software *TM4 Software Suite* erstellt.

Die Analyse der Genexpressionsprofile der Sigmafaktoren verdeutlicht, dass es in  $\Delta$ *ssaA* zu einer Verzögerung der *sigA*-Transkriptakkumulation kam, während die Transkription der Sigmafaktoren SigB, SigC hochreguliert und die von SigG runterreguliert war (Abbildung 2.15). Diese Beobachtungen entsprechen der zuvor beschriebenen verzögerten Expression SigA-abhängiger Gengruppen, wie

ATP-Synthase, PSI, PSII, Phycobilisomen, ribosomale Proteine (Tabelle 2.1) sowie den physiologischen Analysen zum verlangsamten Wiederaanwachsen nach Stickstoffmangel in  $\Delta ss a A$  (Abschnitt 2.2.7.1).

#### 2.2.7.2.5 Expressionsverhalten wichtiger Markergene für die Anpassung an Stickstoffmangel

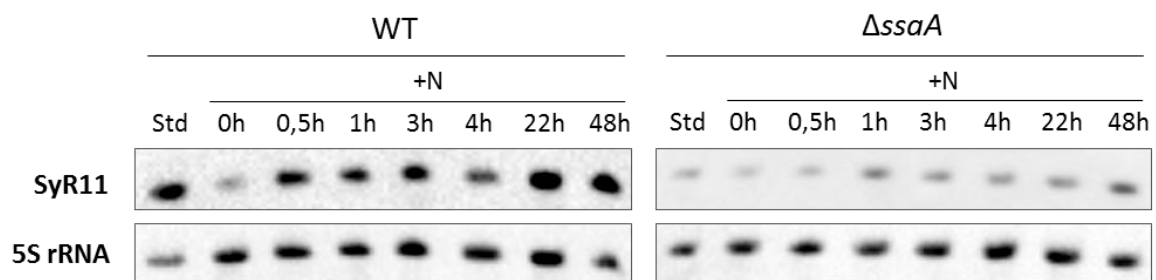
Interessanterweise sind für jene Gene, die für wichtige Proteine der Stickstoffassimilation kodieren, keine signifikanten Expressionsunterschiede in  $\Delta ss a A$  aufgetreten (Heilmann *et al.*, 2017). Dazu gehören Gene der Nitrat-/Nitritassimilation (*nirA*, *nirB*, *nrtA(BCD)*) sowie Gene der Ammoniumassimilation (*amt1(23)*). Dasselbe gilt für wichtige Regulatoren der Stickstoffassimilation, u. a. für den globalen Stickstoffregulator NtcA (der, wie im vorherigen Absatz erwähnt, u. a. die Transkription von *sigE* reguliert), für den Transkriptionsaktivator der Nitratassimilation NtcB, für den Stickstoffregulator P-II GlnB und für die PII Phosphatase PphA. Auch die Expression der Phosphatase RsbU, welche als Anti-Sigmafaktor fungiert und für die Regeneration nach Langzeitstickstoffmangel essentiell ist (Huckauf *et al.*, 2000), verlief in den beiden analysierten Stämmen ohne signifikante Unterschiede. Eine einheitliche Expression in  $\Delta ss a A$  und Wildtyp war auch für NblA1 und NblA2 zu beobachten, deren Expression unter Stickstoffmangelbedingungen induziert wird und die für den Abbau der Phycobilisomen verantwortlich sind (Baier *et al.*, 2014; Krasikov *et al.*, 2012).

#### 2.2.7.2.6 Verifizierung der Daten der *Microarray*-Analyse für die sRNA SyR11

Die vergleichende Genexpressionsanalyse von Wildtyp und  $\Delta ss a A$  ergab ein stark reprimiertes Transkriptlevel der 90 nt langen sRNA SyR11 in der  $\Delta ss a A$ -Mutante unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration (Abschnitt 2.2.7.2.3). Da Hochdurchsatz-Anwendungen zur Analyse der Genexpression, wie die hier verwendete *Microarray*-Analyse während der Versuchsdurchführung aufgrund von experimentellen und biologischen Abweichungen möglichen Schwankungen unterliegen (Leek *et al.*, 2010; Scherer, 2009), wird eine Verifizierung solcher Daten durch alternative Methoden empfohlen. Dafür eignet sich besonders die Northern Blot-Methode, da Variationen der ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstruktur der untersuchten RNA bei dieser Methode keinen Einfluss auf das Ergebnis haben, wie dies u. a. bei qRT/PCR der Fall ist (Ding *et al.*, 2007). Zur Überprüfung der Genexpressionsdaten von SyR11 wurde jeweils eine Flüssigkultur des Wildtyp- sowie des  $\Delta ss a A$ -Stammes in einem zur *Microarray*-Analyse unabhängigen Versuchsaufbau kultiviert. Die Probennahme zur Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte nach Wachstum unter Standardbedingungen (Std.), nach sechstägigem Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen (hier 0h +N) sowie 0,5h, 1h, 3h, 4h, 22h und 48h nach Zugabe von Stickstoff. Für den Nachweis der SyR11-Transkriptmengen wurden die Proben mittels Northern Blot Analyse unter Verwendung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde (DIG-RNA-Sonde) untersucht. Als Referenz dienten 5S rRNA-Transkripte (110 nt), die ebenfalls über eine DIG-RNA-Sonde detektiert wurden.

Die Analyse zeigt einen charakteristischen Akkumulationsverlauf der SyR11-Transkripte in Wildtyp-Zellen. Unter Standardbedingungen war die sRNA hoch abundant, während sie nach sechstägigem Wachstum in stickstofffreiem Medium deutlich reprimiert war (Abbildung 2.16). Bereits eine halbe

Stunde nach Zugabe von Stickstoff war eine Zunahme der Transkriptmenge zu beobachten, die im weiteren Verlauf der Regeneration fast konstant blieb. Diese Beobachtung deckt sich mit dem beschriebenen SyR11-Genexpressionsprofil der *Microarray*-Analyse für *Synechocystis* Wildtyp-Zellen (Abbildung 2.14 F). In 6S RNA-defizienten Zellen waren zudem sowohl unter Standardwachstumsbedingungen als auch unter Stickstoffmangelbedingungen deutlich niedrigere SyR11-Transkriptmengen zu beobachten (Abbildung 2.16). Während des Wiederanwachsens aus Stickstoffmangel wurde einer Zunahme der SyR11-Transkripte verzeichnet, die zum Zeitpunkt 48h +N ihren höchsten Wert erreichte. Insgesamt blieb die SyR11-Transkriptmenge in  $\Delta ssaA$  aber deutlich unterhalb der für Wildtyp-Zellen gemessenen Werten. Demnach konnte das in Abschnitt 2.2.7.2.3 beschriebene reprimierte Genexpressionsprofil von SyR11 in  $\Delta ssaA$  mittels Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Expression von SyR11 in Anwesenheit von 6S RNA positiv reguliert wird. Die in der *Microarray*-Analyse beobachtete prägnante Abnahme der SyR11-Transkripte in  $\Delta ssaA$  für den Zeitpunkt 4h +N (Abbildung 2.14 F) konnte mittels der Northern Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 2.16. Verifizierung der SyR11-*Microarray*-Genexpressionsdaten mittels Northern Blot-Analyse.** Wildtyp- (WT) und  $\Delta ssaA$ -Zellen wurden unter Standardwachstumsbedingungen (Std), unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (+N) bei konstanter Belichtung mit  $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Flüssigkulturen inkubiert. Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Std, 0h +N (entspricht 6d -N) und 0,5h, 1h, 3h, 4h, 22h und 48h +N Proben entnommen. Von jeder Probe wurden  $2 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA über ein 10%iges PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei für die Proben von WT und  $\Delta ssaA$  jeweils zwei getrennte Gele verwendet wurden. Anschließend wurden die Transkripte mittels Northern Blot-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden, gerichtet gegen SyR11 und 5S rRNA, detektiert. 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Die immunologische Detektion erfolgte für beide Membranen im selben zeitlichen Umfang (50sek SyR11; 10sek 5S rRNA). Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

Weiterhin sei angemerkt, dass es unter Stickstoffmangelbedingungen, bezogen auf den Gesamt-RNA-Gehalt, zu einer Zunahme von 5S rRNA-Transkripten und zu einer Abnahme größerer (hauptsächlich ribosomaler) RNA-Transkripte kommt. Dies führt bei gleichbleibender Menge an aufgetragener Gesamt-RNA zu einer Zunahme der 5S rRNA-Transkripte in der Northern Blot-Analyse. Da der Größenunterschied von SyR11 und 5S rRNA nur ca. 20 nt beträgt, ist von einer ähnlichen Zunahme der SyR11-Transkripte im Verhältnis zum Gesamt-RNA-Gehalt auszugehen.

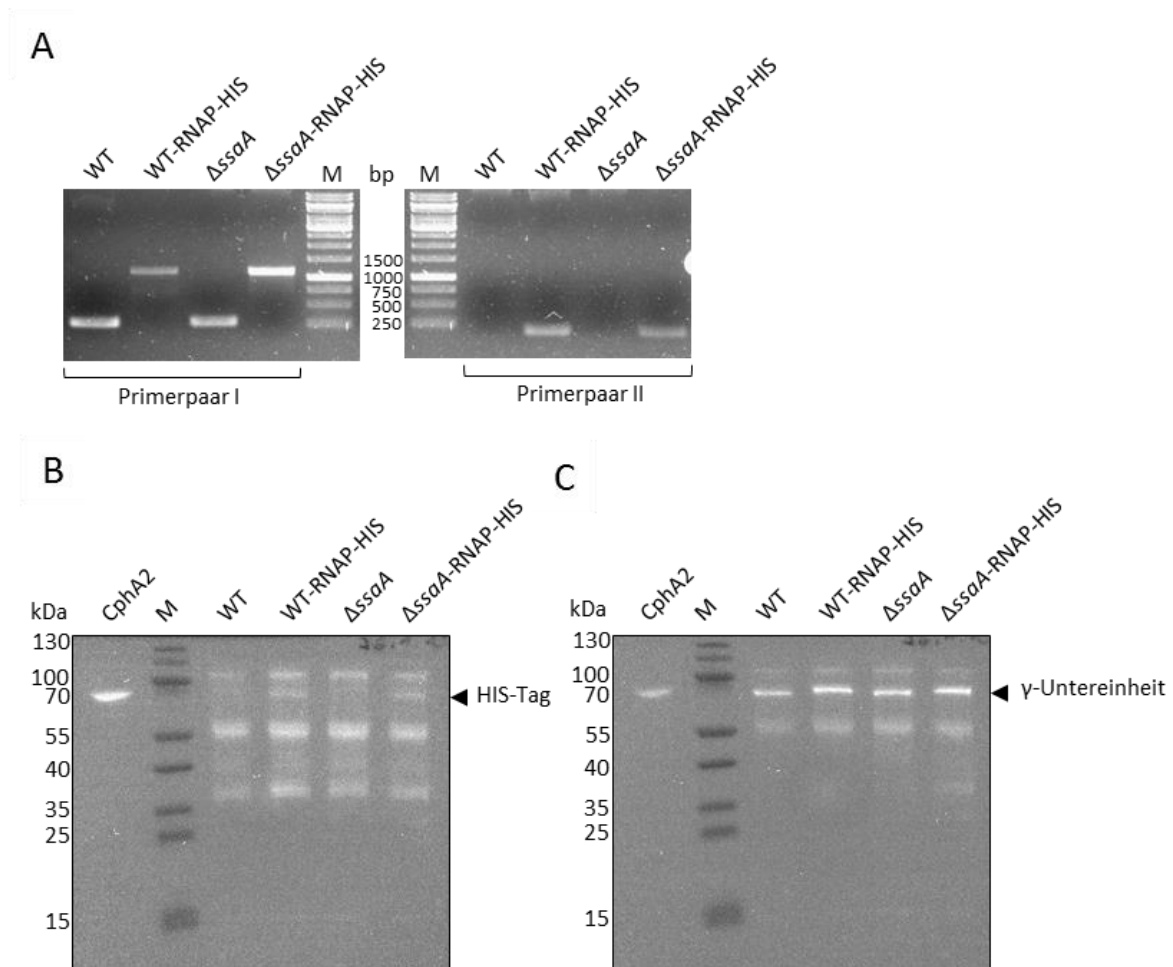
### 2.2.7.3 Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und intrazelluläre Konzentration der Sigmafaktoren unter Stickstoffmangel und während der Regeneration

Die zuvor beschriebene Transkriptomanalyse verdeutlicht den Einfluss von 6S RNA auf die Expression relevanter Gene, einschließlich der Sigmafaktor-Gene, die für die Stressantwort bei Stickstoffmangelbedingungen und für die Regeneration entscheidend sind. Im Anschluss an die Expressionsstudie sollten zwei Aspekte analysiert werden: Zum einen sollte die Rekrutierung der Sigmafaktoren der Gruppe 1 (SigA) und der Gruppe 2 (SigB, SigC, SigD und SigE) durch das RNAP-Coreenzym sowie die Menge der einzelnen Sigmafaktoren im Zytoplasma unter Stickstoffmangelbedingungen und während des Wiederanwachsens nach Stickstoffzugabe untersucht werden. Zusätzlich sollte dabei der Einfluss der 6S RNA auf diesen Mechanismen aufgedeckt werden. Dafür wurden zunächst zwei His-tag-Mutanten generiert: Eine Mutante mit dem genetischen Hintergrund des *Synechocystis*-Wildtyp-Stammes und eine weitere mit dem genetischen Hintergrund der  $\Delta$ ssaA-Mutante. Diese Mutanten wurden anschließend verwendet, um mittels einer *pulldown*-Analyse *in vivo* die Mengen der durch die RNAP gebundenen Sigmafaktoren zu erfassen. Darüber hinaus wurde der Gesamtgehalt der Sigmafaktoren analysiert.

#### 2.2.7.3.1 Konstruktion und Verifizierung einer WT-RNAP-HIS- und einer $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS-Mutante

Für die Generierung einer WT-RNAP-HIS-Mutante und einer  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS-Mutante wurde die native  $\gamma$ -Untereinheit (*rpoC1*) der RNAP sowohl im *Synechocystis* Wildtyp als auch in der  $\Delta$ ssaA-Mutante durch eine modifizierte  $\gamma$ -Untereinheit mit einem neun Aminosäuren langen Polyhistidin-*tag* am C-Terminus und einer Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette ersetzt. Dafür wurden der Wildtyp-Stamm und die  $\Delta$ ssaA-Mutante mit dem in Koskinen *et al.* (2016) beschriebenen und von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Taina Tyystjärvi (Universität Turku, Finnland) zur Verfügung gestellten Plasmid pMA-T-His-Tag-Cm transformiert. Die transformierten Klone wurden anschließend auf BG11-Festmedium mit Cm selektiert. Der erfolgreiche Plasmidtransfer sowie die vollständige Segregation der generierten HIS-Mutanten wurde mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare I (Chis3end\_Fw/Chis3end\_Rv; zum Nachweis der Cm<sup>r</sup>) und II (Chis3end\_Fw/C-HIStag\_R; zum Nachweis des His-*tag*) überprüft (Abbildung 2.17 A). Die Primersequenzen sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Zusätzlich wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt, um den His-*tag* sowie die  $\gamma$ -Untereinheit der RNAP in den generierten Mutanten auf Proteinebene zu detektieren (Abbildung 2.17 B und C).

Mithilfe der Immunoblot-Analyse konnte die Expression des His-*tag* in den Stämmen WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS anhand der Detektion einer zusätzlichen Bande in Höhe von ca. 70-75 kDa erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 2.17 B). Als Positivkontrolle wurde das von Klemke *et al.* (2016) generierte und zur Verfügung gestellte His-fusionierte Protein CphA2-His (75 kDa) verwendet. Die übrigen sichtbaren Banden sind auf Kreuzreaktionen des RGS-HIS-tag Antikörpers zurückzuführen (Abbildung 2.17 B).



**Abbildung 2.17. Generierung der His-tag Mutanten WT-RNAP-HIS- und ΔssaA-RNAP-HIS.** **A:** PCR zum Nachweis der erfolgreichen Rekombination der  $Cm^r$  (Primerpaar I: Chis3end-Fw/Chis3end-Rv) und des His-tag (Primerpaar II: Chis3end-Fw/C-HIStag\_R) in WT-RNAP-HIS und ΔssaA-RNAP-HIS. Die PCR-Produkte wurden über ein 1%iges, mit Midori Green gefärbtes Agarosegel aufgetrennt. M: Größenstandard (1kb DNA Ladder) **B** und **C:** Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Expression des His-tag (**B**) und der γ-Untereinheit der RNAP (**C**) in WT-RNAP-HIS und ΔssaA-RNAP-HIS. Für die Analyse wurden zunächst je 70 μg der löslichen Zellextrakte von WT und WT-RNAP-HIS sowie von ΔssaA und ΔssaA-RNAP-HIS über eine Tricin-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurden 0,25 μg des Proteins CphA<sub>2</sub>-His (75 kDa) als Positivkontrolle aufgetragen. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und zuerst mit dem Antikörper RGS-HIS-tag (für den Nachweis des His-tag; **B**) und anschließend mit dem Antikörper anti-gamma (für den Nachweis der γ-Untereinheit der RNAP; **C**) hybridisiert. M: Größenstandard

Anschließend erfolgte die Inkubation derselben Membran mit dem Antikörper anti-gamma, mithilfe dessen die γ-Untereinheit der RNAP in den beiden Ausgangsstämmen Wildtyp und ΔssaA sowie auch in den beiden His-tag Mutanten WT-RNAP-HIS und ΔssaA-RNAP-HIS detektiert werden konnte. Das für WT-RNAP-HIS und ΔssaA-RNAP-HIS im Vergleich zum Wildtyp und ΔssaA zu beobachtende, leicht erhöhte Laufverhalten der γ-Untereinheit ist auf die zusätzlichen 9 Histidine des assoziierten Polyhistidin-tag zurückzuführen (Abbildung 2.17 C). Die in Abbildung 2.17 C darüber hinaus erkennbaren Banden stammen von der vorangegangenen Hybridisierung mit dem RGS-HIS-tag Antikörper.



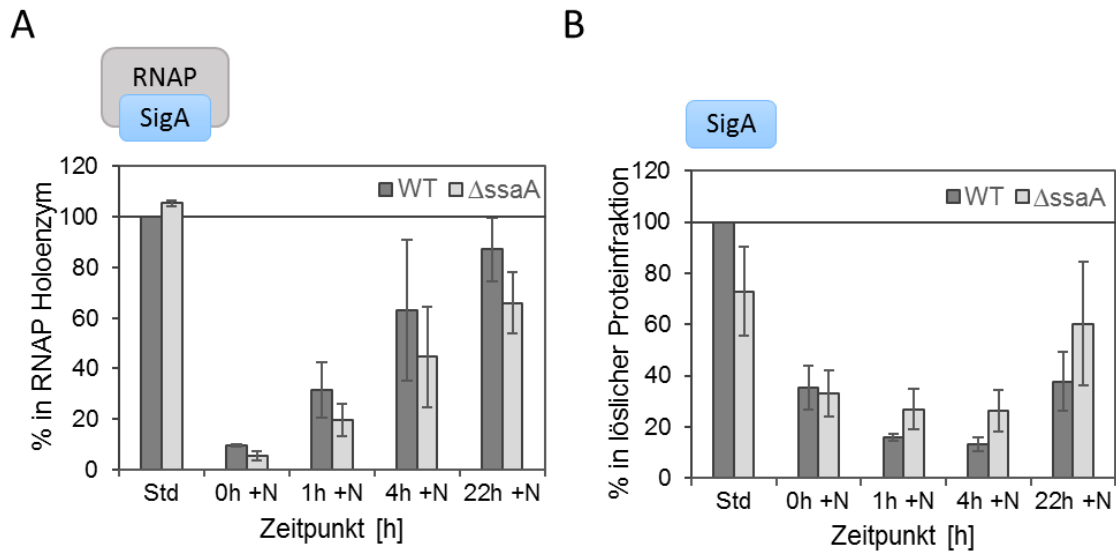
### 2.2.7.3.2 *In vivo*-Pull-down-Analyse: Intrazelluläre Konzentration der Sigmafaktoren und ihre Rekrutierung durch die RNAP

Um den Einfluss von 6S RNA auf das regulatorische Transkriptionsnetzwerk *in vivo* unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration zu untersuchen, wurde der zelluläre Gesamtgehalt der Sigmafaktoren der Gruppe 1 (SigA) und der Gruppe 2 (SigB, SigC und SigE) sowie die Quantität der Bindung der Sigmafaktoren an das RNAP-Coreenzym ermittelt. Dafür wurde eine spezifische *pull-down*-Analyse mit den Mutanten WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS (siehe Abschnitt 2.2.7.3.1) durchgeführt. Die *in vivo*-*pull-down*-Analyse wurde nach der von Koskinen *et al.* (2016) beschriebenen Methode während eines Forschungsaufenthalts in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Taina Tyystjärvi an der Universität Turku durchgeführt. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden Zellen der beiden Stämme WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS unter Standardwachstumsbedingungen (Std), nach sechs Tagen unter Stickstoffmangelbedingungen (0h +N) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten während der Regeneration (1h, 4h und 22h +N) verwendet. Die Regeneration der Zellen wurde durch Zugabe von 17,6 mM NaNO<sub>3</sub> initiiert. Für die *pull-down*-Analyse des RNAP-Holoenzym wurden *Dynabeads* Magnetperlen (*Dynabeads® His-Tag Isolation and Pull-down*) genutzt. *Dynabeads* binden His-fusionierte Proteine mit hoher Selektivität auf Grundlage der auf Kobalt-basierten immobilisierten Metallchelatchromatographie (IMAC). Nach Elution der gebundenen RNAP-Holoenzyme wurden diese über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Parallel dazu wurde eine definierte Proteinmenge der löslichen Proteinfraction ebenfalls mittels SDS-PAGE analysiert. Im Anschluss erfolgte eine Immunoblot-Analyse unter Einsatz spezifischer Antikörper gerichtet gegen die Sigmafaktoren SigA, SigB, SigC, SigD und SigE sowie gegen die RNAP-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ .

Um den Gehalt der jeweiligen Sigmafaktoren zu ermitteln, wurden die Werte von SigA, SigC und SigE gegen den Gehalt von  $\alpha$  und die Werte von SigB gegen den Gehalt von  $\beta$  quantifiziert. Dabei sei erwähnt, dass in den Stickstoffmangelproben (0h +N) ein höherer und in den Proben aus den ersten Stunden nach Zugabe von Stickstoff (1h +N und 4h +N) ein niedrigerer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Gehalt als unter Standardbedingungen gemessen wurde. Die normierten Werte der einzelnen Sigmafaktoren sind in den Abbildungen 2.18.(SigA) und 2.19 (SigB, SigC und SigE) dargestellt.

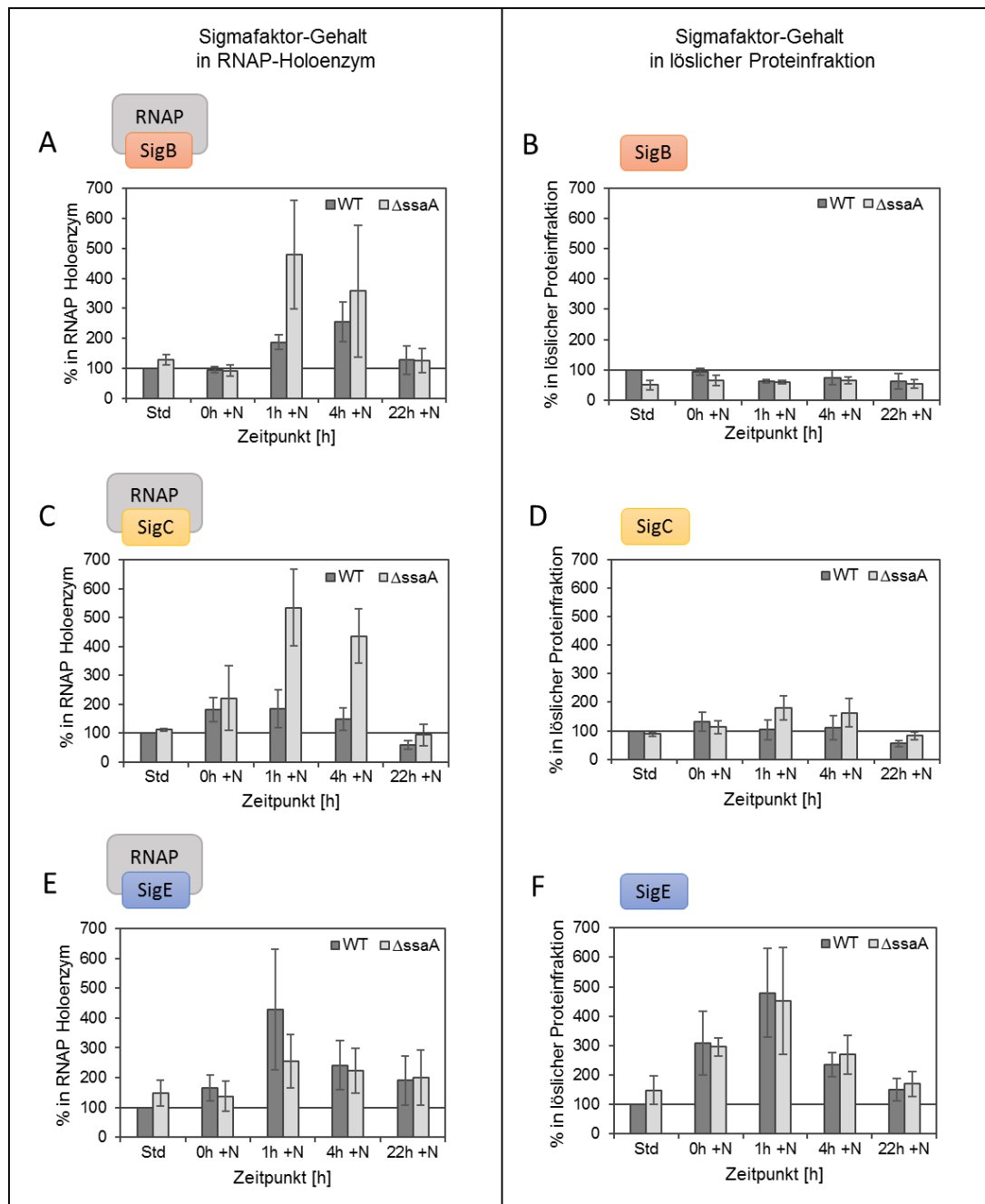
Eine Detektion von SigD mit einem spezifischen Antikörper war nicht möglich, da die Bandenintensitäten unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die Untersuchungen dazu sind daher nicht dargestellt.

Zur besseren Übersicht werden die His-fusionierten Stämme WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS in den nachfolgenden Abschnitten als WT bzw.  $\Delta$ ssaA bezeichnet. Darüber hinaus sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den gezeigten Messwerten um relative Mengenangaben handelt. Aussagen über den tatsächlichen Gehalt der einzelnen Sigmafaktoren bzw. ihr Mengenverhältnis zueinander können daraus nicht direkt abgeleitet werden. Die Versuche sollten in erster Linie die Differenzen zwischen WT und  $\Delta$ ssaA erkunden und den zeitlichen Verlauf der Sigmafaktor-Rekrutierung nachvollziehbar machen.



**Abbildung 2.18. Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und Gehalt von SigA.** Für die Untersuchung wurden Flüssigkulturen der His-tag Mutanten WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS unter Standardbedingungen (Std.), unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (+N) inkubiert. Zu den Zeitpunkten Std., 0h +N (6d -N) und 1h +N, 4h +N und 22h +N nach Stickstoffzugabe wurden definierte Probenvolumina entnommen. **A:** Pulldown-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von 6S RNA auf die Rekrutierung von SigA durch das RNAP-Coreenzym. Nach Extraktion der löslichen Proteinfraction wurden 900  $\mu$ g für die pulldown-Analyse eingesetzt. Für die Elektrophorese wurden 10  $\mu$ l der isolierten His-tag RNAP über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. **B:** Analyse des SigA-Gehalts in WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS-Zellen. Von der löslichen Proteinfraction wurden 5  $\mu$ g über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. **A** und **B:** SigA und die  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP wurden mittels Immunoblotting detektiert und ihr Gehalt quantifiziert. Gezeigt sind die Werte für SigA, normiert gegen die Werte für  $\alpha$ . Die Werte aller Zeitpunkte wurden jeweils auf den Std-Wert des WT-RNAP-HIS-Stammes normiert. Dieser Wert wurde gleich 100 % gesetzt. Die Daten illustrieren den Mittelwert und den Standardfehler von jeweils drei biologischen Replikaten. WT = WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ ssaA =  $\Delta$ ssaA-RNAP-HIS. Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

Die Untersuchungen zum Einfluss von 6S RNA auf den Gehalt des Gruppe 1 Sigmafaktors SigA zeigen, dass der Gehalt von SigA-assoziierten RNAP-Holoenzymen unter Stickstoffmangelbedingungen im Vergleich zu Standardbedingungen stark reduziert war ( $\sim 10\%$ ). Dabei sind nur geringe Unterschiede zwischen WT- und  $\Delta$ ssaA-Stamm zu erkennen (Abbildung 2.18 A). Der Gesamtgehalt von SigA ist hingegen in beiden Stämmen unter Stickstoffmangelbedingungen nur um ca. 65 % zurückgegangen (Abbildung 2.18 B). Dies spricht für eine starke Abnahme der SigA-Rekrutierung durch die RNAP im Verhältnis zum SigA-Gehalt. Zudem fällt auf, dass in  $\Delta$ ssaA unter Standardbedingungen weniger SigA in der löslichen Proteinfraction vorhanden war als im WT (Abbildung 2.18 B). Für die Regenerationsphase nach Zugabe von Stickstoff konnte eine schnellere Zunahme der SigA-assoziierten RNAP-Holoenzyme für den WT ermittelt werden (Abbildung 2.18 A). In Zellen ohne 6S RNA wurde jedoch ein schnellerer Anstieg des SigA-Gehalts gemessen (Abbildung 2.18 B).



**Abbildung 2.19. Einfluss von 6S RNA auf Rekrutierung und Gehalt der Sigmafaktoren SigB, SigC und SigE.** Für die Untersuchung wurden Flüssigkulturen der *His-tag* Mutanten WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ *ssaA*-RNAP-HIS unter Standardbedingungen (Std.), unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (+N) inkubiert. Zu den Zeitpunkten Std., 0h +N (6d -N) und 1h +N, 4h +N und 22h +N nach Stickstoffzugabe wurden definierte Probenvolumina entnommen. **A, C und E:** *Pulldown*-Analyse zur Untersuchung des Einflusses von 6S RNA auf die Rekrutierung der Sigmafaktoren durch RNAP. Nach Extraktion der löslichen Proteinfraction wurden 900  $\mu$ g für die *pulldown*-Analyse eingesetzt. Für die Elektrophorese wurden 10  $\mu$ l der isolierten *His-tag* RNAP über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. **B, D und F:** Analyse des Gehalts der Sigmafaktoren in WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ *ssaA*-RNAP-HIS-Zellen. Von der löslichen Proteinfraction wurden je 25  $\mu$ g für die Detektion von SigB und SigE und 15  $\mu$ g für die Detektion von SigC über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt. **A - E:** SigB, SigC, SigE sowie die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der RNAP wurden mittels Immunoblotting detektiert und ihr Gehalt quantifiziert. Gezeigt sind die Werte von SigB, SigC und SigE, normiert gegen die Werte für  $\alpha$  (SigC und SigE) bzw.  $\beta$  (SigB). Die Werte aller Zeitpunkte wurden jeweils auf den Std-Wert des WT-RNAP-HIS-Stammes normiert. Dieser Wert wurde gleich 100 % gesetzt. Die Daten illustrieren den Mittelwert und den Standardfehler von jeweils drei biologischen Replikaten. WT = WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ *ssaA* =  $\Delta$ *ssaA*-RNAP-HIS. Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

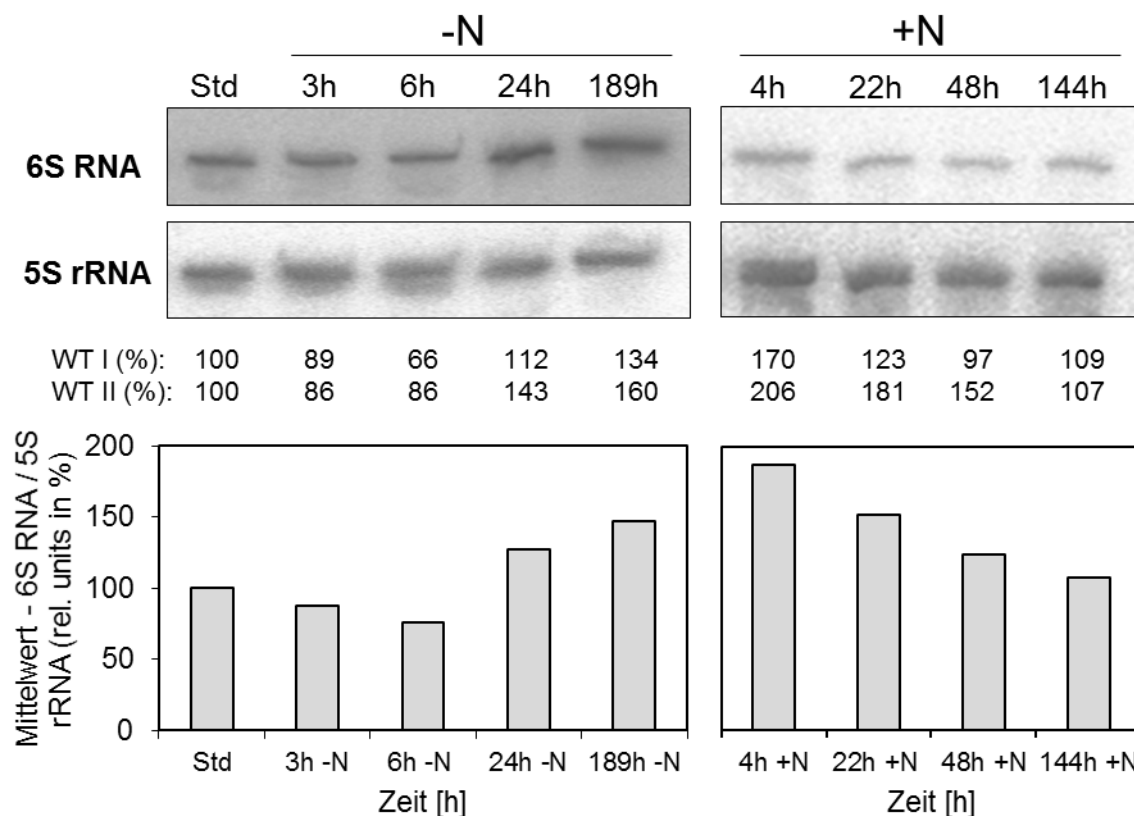
Während es unter Stickstoffmangel zu einer starken Abnahme des für die Expression der essentiellen Haushaltsgene verantwortlichen Sigmafaktors SigA kam (Abbildung 2.18), ergibt sich für die Gruppe 2 der Sigmafaktoren ein anderes Bild: Der Gehalt von SigB-assoziierten RNAP-Holoenzymen blieb unter Standardbedingungen und unter Stickstoffmangel nahezu konstant (Abbildung 2.19 A). Wenige Stunden nach Zugabe von Stickstoff (1h +N und 4h +N) war für beide Stämme ein starker Anstieg der SigB-RNAP-Holoenzyme zu beobachten, wobei der Anstieg in  $\Delta ssaA$  für den Zeitpunkt 1h +N im Mittel um das 2,5-Fache höher ausfiel als im WT (Abbildung 2.19 A). Demzufolge wird SigB vor allem in der frühen Phase der Regeneration von RNAP-Coreenzymen rekrutiert. Dieser Effekt wird durch die Abwesenheit von 6S RNA verstärkt. Der Gesamtgehalt von SigB blieb in WT-Zellen unter Standardbedingungen und Stickstoffmangel nahezu konstant. Unter stickstoffkomplementierten Bedingungen wurde eine Abnahme von bis zu ~ 35 % (1h +N) ermittelt. In  $\Delta ssaA$  konnte für alle Zeitpunkte eine konstante SigB-Menge detektiert werden, welche jedoch mit 35 - 50 % unterhalb der für den WT gemessenen Menge liegt (Abbildung 2.19 B). Ähnlich wie für SigB, verhält es sich auch für SigC. In  $\Delta ssaA$  wurde im Vergleich zum WT eine größere Menge der SigC-assoziierten RNAP-Holoenzyme nach Stickstoffzugabe nachgewiesen. Dabei war für beide Stämme bereits unter Stickstoffmangelbedingungen eine Zunahme der SigC-Rekrutierung zu erkennen (Abbildung 2.19 C). Die Analyse der löslichen Proteinfraction ergab für  $\Delta ssaA$  einen Anstieg des SigC-Gehalts während der frühen Phase nach Stickstoffzugabe (Abbildung 2.19 D). Die Rekrutierung von SigE durch die RNAP war bei Stickstoffmangel und nach Zugabe von Stickstoff in beiden Stämmen erhöht, wobei eine zusätzliche Zunahme für den WT zum Zeitpunkt 1h +N gemessen wurde (Abbildung 2.19 E). Im Gegensatz zu SigB und SigC stieg die SigE-Menge in beiden Stämmen unter Stickstoffmangel und während der frühen Phase der Regeneration deutlich an (Abbildung 2.19 F). Interessanterweise war der Gesamtgehalt von SigE sowie auch der Gehalt an SigE-assoziierten RNAP-Holoenzymen in  $\Delta ssaA$  im Vergleich zum WT unter Standardbedingungen um ~ 50 % erhöht (Abbildung 2.19.E und F).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass 6S RNA den Gehalt der Sigmafaktoren der Gruppen 1 und 2 sowie ihre Rekrutierung durch die RNAP beeinflusst. In Abwesenheit von 6S RNA wird SigA trotz eines höheren SigA-Gehalts während der Regeneration aus Stickstoffmangel langsamer rekrutiert, während verstärkt SigB-RNAP- und SigC-RNAP-Holoenzyme gebildet werden. Diese Beobachtung untermauert die im Abschnitt 2.2.7.2 dargestellten Ergebnisse zur *Microarray*-Analyse, wonach die Expression von SigA-abhängigen Haushaltsgenen in  $\Delta ssaA$  während der Regeneration runterreguliert ist und das Wiederanwachsen der Zellen verzögert stattfindet.

#### 2.2.7.4 Analyse der 6S RNA-Transkriptakkumulation unter Stickstoffmangel und während der Regeneration

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Analyse der 6S RNA-Transkriptmenge unter Stickstoffmangel und während der Regeneration. Da es sich bei der 6S RNA um eine hoch abundante sRNA handelt und das *Microarray*-Signal der 6S RNA-Transkriptmenge zu allen gemessenen Zeitpunkten gesättigt war, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden zwei

Flüssigkulturen des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes unter Standardwachstumsbedingungen, unter Stickstoffmangelbedingungen und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen inkubiert. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden zu den folgenden Zeitpunkten Proben genommen: unter Standardbedingung (Std.), nach acht Tagen unter Stickstoffmangel (189h -N) sowie 4h, 22h, 48h und 144h (+N) nach Stickstoffzugabe. Darüber hinaus wurden mit 3h, 6h und 24h -N drei zusätzliche Zeitpunkte ausgewählt, um die 6S RNA-Transkriptmenge in der frühen Phase der Adaptation an Stickstoffmangel zu verfolgen. Die Detektion der 6S RNA-Transkriptmenge wurde mittels Elektro-*Blotting* und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen [ $\alpha$   $P^{32}$ ]-markierten DNA-Sonde realisiert. Die 6S RNA-Transkriptmenge wurde gegen die Menge der 5S rRNA-Transkripte quantifiziert.



**Abbildung 2.20. Analyse der 6S RNA-Transkriptakkumulation unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regenerationsphase.** Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden aus zwei Flüssigkulturen (WT I und WT II) des *Synechocystis* WT-Stammes unter Standardwachstumsbedingungen (Std.), nach Stickstoffentzug (3h, 6h, 24h und 189h -N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (4h, 22h, 48h und 144h +N) Proben für die Extraktion von Gesamt-RNA entnommen. Anschließend wurden pro Zeitpunkt je 5 µg Gesamt-RNA über zwei 10%ige PAGE aufgetrennt und durch Elektro-*Blotting* auf Nylonmembranen transferiert. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden, gerichtet gegen 6S RNA- und 5S rRNA-Transkripte. Die 5S rRNA-Transkriptmenge diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind die Autoradiogramme für WT I. Für die Quantifizierung der 6S RNA-Transkriptmengen wurde die Intensität der 6S RNA-Banden durch die Intensität der 5S rRNA-Banden dividiert. Die 6S RNA-Transkriptmengen wurden auf den Wert, der unter Standardbedingungen ermittelt wurde, normiert. Die Werte der Std. Proben wurden auf 100 % gesetzt. Die quantifizierten 6S RNA-Transkriptmengen der beiden biologischen Replikate (WT I und WT II) sind als Einzelzahlen sowie graphisch als Mittelwerte dargestellt, jeweils in %. Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

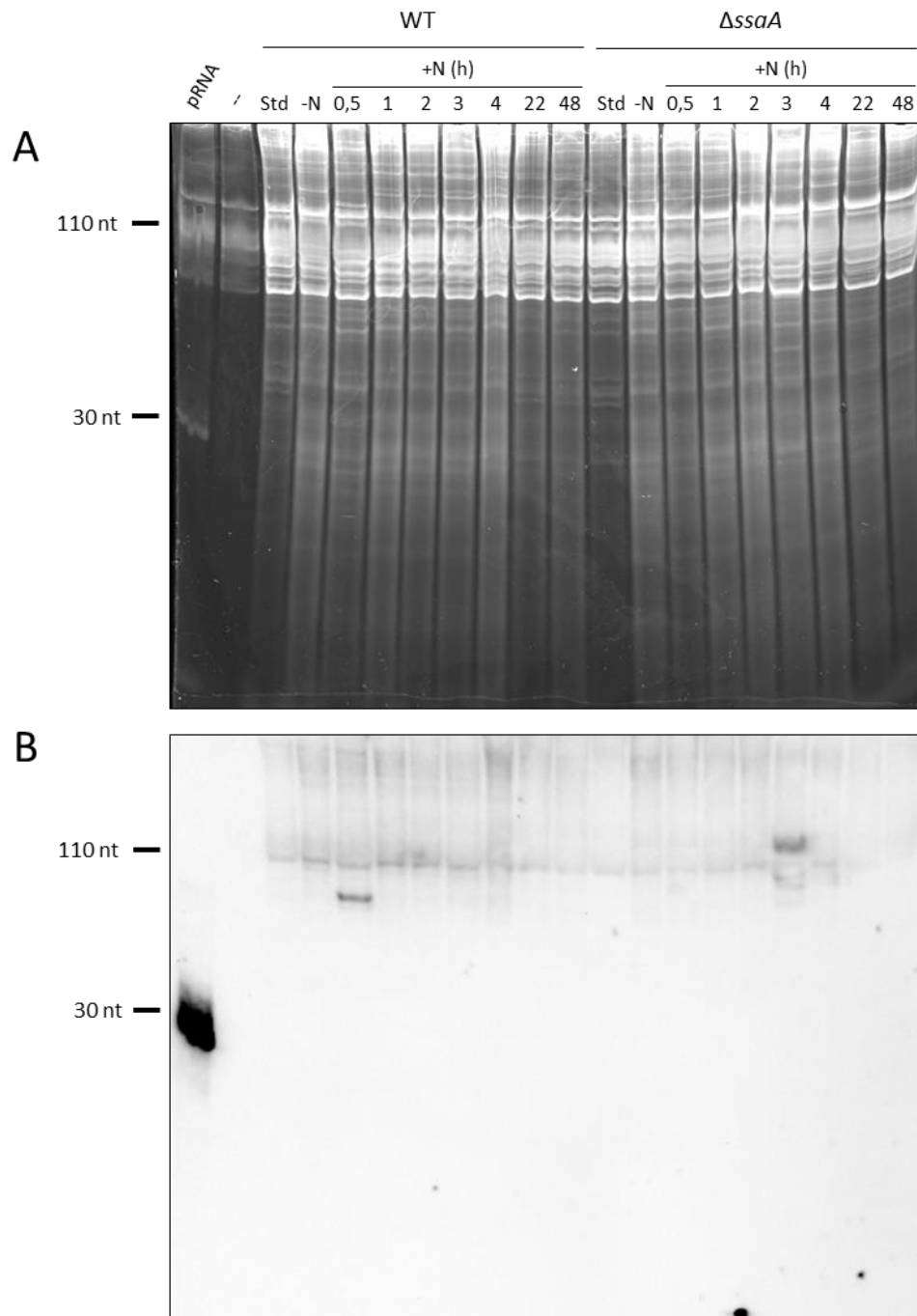
Die Untersuchung zeigt, dass die 6S RNA-Transkriptmenge in der frühen Phase der Adaptation (3h und 6h -N) um 11 - 34 % reduziert ist (Abbildung 2.20). Hingegen ist einen Tag (24h -N) sowie knapp acht Tage (189h -N) nach Stickstoffentzug eine Zunahme der 6S RNA-Transkripte um im Durchschnitt 28 % (24h -N) bzw. 47 % (189h -N) zu beobachten. Der höchste 6S RNA-Gehalt wurde 4h nach Stickstoffzugabe (+N) gemessen. Anschließend nimmt die Transkriptmenge wieder ab und liegt nach sechs Tagen nur noch leicht über dem Ausgangswert (Abbildung 2.20).

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass es unter Stickstoffmangelbedingungen zu einem Rückgang der ribosomalen RNAs kommt (Sauer *et al.*, 2001). Inwieweit dies für den zuvor beschriebenen 6S RNA-Transkriptverlauf von Bedeutung ist, wird in Abschnitt 3.4.4 diskutiert.

#### 2.2.7.5 Analyse der pRNA-Synthese unter Stickstoffmangel und während der Regeneration

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die 6S RNA in *Synechocystis* für das Wiederanwachsen der Zellen aus Stickstoffmangel eine entscheidende Rolle spielt. Da sich *Synechocystis*-Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen in einer Art Überdauerungszustand befinden, welcher mit der stationären Wachstumsphase in *E. coli* oder *B. subtilis* vergleichbar ist, wurde im Folgenden überprüft, ob sich *in vivo*-synthetisierte pRNAs während der Regenerationsphase in *Synechocystis*-Zellen nachweisen lassen. Mittels *in vitro*-Studien konnte unter Verwendung von *Synechocystis* 6S RNA und *E. coli* RNAP von Rediger *et al.* (2012) bereits gezeigt werden, dass die 6S RNA aus *Synechocystis* ebenfalls als *Template* für die Synthese von bis zu 30 nt langen pRNAs fungieren kann. Der mittels *dRNA-Seq*-Analysen nachgewiesene Transkriptionsstartpunkt für pRNA-Transkripte lässt außerdem auf eine potentielle Synthese von pRNA-Transkripten in *Synechocystis* schließen (Mitschke *et al.*, 2011a).

In *B. subtilis* erfolgte der Nachweis *in vivo*-synthetisierter pRNAs, sowohl für 6S-1 RNA als auch für 6S-2 RNA, unter Verwendung spezifischer RNA-LNA-Sonden (Beckmann *et al.*, 2010; Hoch *et al.*, 2016). Da die Detektion von *in vivo*-synthetisierten pRNAs in *Synechocystis* mittels herkömmlicher Northern Blot-Analysen erfolglos blieb, wurde für die Hybridisierung ebenfalls eine spezifische RNA-LNA-Sonde eingesetzt, um die Affinität zur komplementären pRNA-Sequenz zu erhöhen. Für die Analyse von pRNA-Transkripten in *Synechocystis* Wildtyp-Zellen wurden je 15 µg Gesamt-RNA, extrahiert aus exponentiell wachsenden Zellen ( $OD_{750nm} = 0,7 - 0,8$ ), nach sechs Tagen unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten während der Regeneration (0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 22h und 48h +N) über ein 20%iges natives PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 2.21 A). Als Negativkontrolle dienten vergleichbare Proben der *DssaA*-Mutante. Nachdem die Gesamt-RNA auf eine Nylon-Membran transferiert und chemisch vernetzt wurde, erfolgte die Hybridisierung mit einem spezifischen DIG-markierten RNA-LNA-Oligonukleotid (Gesamtlänge: 30 nt, davon 7 LNAs). Als Indikator für eine erfolgreiche Durchführung der Northern Blot-Analyse dienten *in vitro*-generierte pRNAs, mit einer Länge von 30 nt, die erfolgreich detektiert werden konnten (Abbildung 2.21 B).



**Abbildung 2.21. Northern Blot-Analyse der pRNA-Synthese in *Synechocystis* Wildtyp-Zellen während der Regeneration nach Stickstoffmangel.** *Synechocystis* Wildtyp-(WT) und  $\Delta ssaA$ -Zellen wurden unter Standardwachstumsbedingungen (Std), unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) und unter stickstoffkomplementierten Bedingungen (+N) bei konstanter Belichtung mit  $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Flüssigkulturen inkubiert. Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Std, 6d -N und 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 22h und 48h +N Proben entnommen. Pro Probe wurden je  $15 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA über ein 20%iges natives PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. pRNA:  $0,25 \mu\text{g}$  *in vitro*-generierter pRNAs (30mer) dienten als Positivkontrolle. Die RNA wurde mit GelRed-Lösung angefärbt und durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht (A). Im Anschluss wurde die RNA über Nacht mittels Elektro-Blotting auf eine Nylonmembran transferiert und durch Inkubation mit einer EDC-Lösung chemisch auf der Membran vernetzt (*crosslinking*). Anschließend erfolgte die Northern Blot-Hybridisierung ÜN bei  $51^\circ\text{C}$  mit einer spezifischen DIG-markierten RNA-LNA-Sonde ( $3000 \text{ pmol}$ ), gerichtet gegen pRNA (B).

In den Proben des Wildtyp-Stammes wurden, in dem zu erwartenden Größenbereich von ca. 30 nt, keine pRNAs-Transkripte nachgewiesen. Jedoch ist in der Spur der Probe 0,5h +N eine deutliche Bande in Höhe von ca. 80 - 90 nt zu erkennen (Abbildung 2.21 B). Die beiden Tatsachen, dass die Länge dieser RNA-Transkripte die zu erwartende pRNA-Transkriptlänge deutlich übersteigt und, dass nur eine einzelne Bande und nicht, wie für *E. coli* und *B. subtilis* gezeigt, pRNA-Transkripte verschiedener Längen zu erkennen sind, spricht gegen eine nachweisliche Detektion *in vivo*-synthetisierter pRNA-Transkripte in *Synechocystis*. Demnach konnten trotz der Auswahl einer hoch sensitiven Methode und des Einsatzes einer spezifischen RNA-LNA-Sonde zu den gewählten Zeitpunkten keine pRNA-Transkripte in den *Synechocystis*-Zellen nachgewiesen werden.

In allen Proben wurde eine Bande bei ca. 110 nt beobachtet. Dabei handelt es sich vermutlich um die 5S rRNA, welche sehr abundant ist und deren Detektion aufgrund von Kreuzreaktionen denkbar ist (Abbildung 2.21 B).

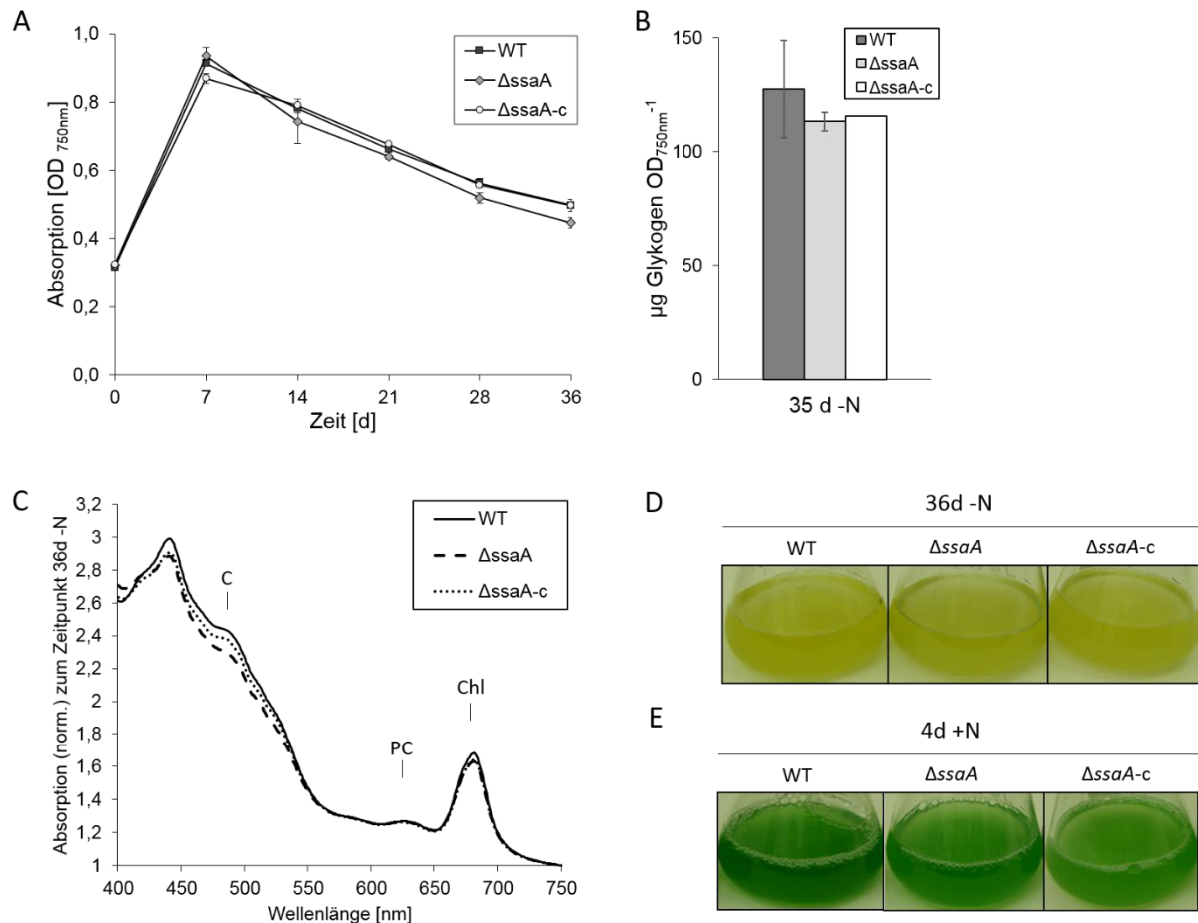
#### 2.2.7.6 Wachstum unter Langzeitstickstoffmangel

Dank spezifischer Anpassungsmechanismen können nicht-diazotrophe Cyanobakterien neben kürzeren Schwankungen im Nährstoffangebot auch Nährstoffmangel für längere Perioden überstehen. Für *Synechococcus* PCC 7942 wurde gezeigt, dass das Überdauern von Stickstoffmangel mithilfe eines dreistufigen Akklimatisierungsprozesses für einen Zeitraum von mindestens sechs Monate möglich ist (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). Ähnlich wie *Synechococcus*-Zellen reagieren *Synechocystis*-Zellen auf Stickstoffentzug mit dem Abbau der Phycobilisomen (Baier *et al.*, 2014; Richaud *et al.*, 2001) und der Akkumulation von Glykogen als Speicher für Kohlenstoff (Gründel *et al.*, 2012). Es ist daher davon auszugehen, dass *Synechocystis*-Zellen auch langanhaltende Stickstoffmangelbedingungen mit reduziertem Stoffwechsel überdauern können.

Zur Analyse des Einflusses von 6S RNA auf die Anpassung an Langzeitstickstoffmangel in *Synechocystis* wurden je drei Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta$ ssaA und der Komplementationsmutante  $\Delta$ ssaA-C zunächst unter Standardwachstumsbedingungen angezogen und anschließend für 36 Tage unter Stickstoffmangelbedingungen kultiviert. Während der Anzucht unter Langzeitstickstoffmangel zeigten die drei untersuchten Stämme ab dem zweiten Messpunkt, 14 Tage -N, eine rückläufige Zelldichte ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 2.22 A). 35 Tage nach Stickstoffentzug aus dem Medium wurde in allen drei Stämmen ein ähnlich hoher Glykogengehalt von 113 – 127  $\mu$ g pro OD<sub>750nm</sub> ermittelt (Abbildung 2.22 B). Ein Vergleich der Absorptionsspektren ganzer Zellen in dem Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm zeigte 36 Tage nach Stickstoffentzug ebenfalls ein nahezu einheitliches Bild der drei Stämme, wobei sowohl der Carotinoid-*peak* (bei ca. 500 nm) als auch der Chlorophyll-*peak* (bei ca. 681 nm) in  $\Delta$ ssaA und  $\Delta$ ssaA-C leicht reduziert sind (Abbildung 2.22 C). Deutlich zu erkennen ist in allen drei Stämmen der stark reduzierte Phycocyanin-*peak* mit einem Absorptionsmaximum bei 620 - 635 nm (Abbildung 2.22 C). Auch morphologisch war die Chlorose der Zellen in allen drei Stämmen zum Zeitpunkt 36 Tage -N einheitlich ausgeprägt (Abbildung 2.22 D). Um zu untersuchen, ob die drei analysierten Stämme nach Langzeitstickstoffmangel in der Lage waren durch Zugabe von Stickstoff zu regenerieren und wiederanzuwachsen, wurde zum Zeitpunkt 36d -N



durch Zugabe von 17,6 mM  $\text{NaNO}_3$  der fehlende Stickstoff komplementiert. Vier Tage nach Zugabe des Stickstoffs konnte in allen Stämmen ein Farbumschlag von gelb zu blau-grün beobachtet werden (Abbildung 2.22 E).



**Abbildung 2.22. Analyse der Adaptation von Wildtyp,  $\Delta\text{ssaA}$  und  $\Delta\text{ssaA-C}$  an Langzeitstickstoffmangel.**

Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp (WT),  $\Delta\text{ssaA}$  und der  $\Delta\text{ssaA-C}$ -Zellen wurden zunächst unter Standardwachstumsbedingungen bis zu einer Zelldichte von  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 1$  kultiviert. Anschließend wurde ein *Step down* durchgeführt, um den Stickstoff aus dem BG11-Medium zu entfernen. Die Flüssigkulturen wurden auf eine  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  von 0,3 eingestellt und in stickstofffreiem BG11-Medium bei 30 °C unter kontinuierlicher Begasung bei einer Lichtintensität von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen}$  über einen Zeitraum von 36 Tagen (36d) kultiviert. **A:** Wachstumskurve der drei Stämme unter Langzeitstickstoffmangel, aufgenommen über einen Zeitraum von 36d. Die Absorption der Zellen wurde spektrophotometrisch bei 750nm zu den dargestellten Zeitpunkten bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von je drei biologischen Replikaten. Die Messpunkte von  $\Delta\text{ssaA-C}$  bei 14, 21, 28 und 36d -N basieren auf zwei biologischen Replikaten. **B:** Glykogengehalt der Flüssigkulturen zum Zeitpunkt 35d -N, normiert gegen die Absorption bei 750 nm. Für die Bestimmung des Glykogengehalts wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur für den durch Amyloglucosidase katalysierten enzymatischen Abbau von Glykogen zu Glukose eingesetzt. Die Glukosemenge wurde anschließend mithilfe der Hexokinase-Methode enzymatisch bestimmt und bei einer Anregung von 340 nm spektrophotometrisch gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei (WT und  $\Delta\text{ssaA}$ ), bzw. zwei ( $\Delta\text{ssaA-C}$ ) biologischen Replikaten. **C:** Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen von WT,  $\Delta\text{ssaA}$  und  $\Delta\text{ssaA-C}$  nach 36-tägigem Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen (36d -N), normiert auf die  $\text{OD}_{750\text{nm}}$ . C: Carotinoide; PC: Phycocyanin; Chl: Chlorophyll *a*. **D:** Zellkulturen von WT,  $\Delta\text{ssaA}$  und  $\Delta\text{ssaA-C}$  zum Zeitpunkt 36d -N. **E:** Nach 36d Langzeitstickstoffmangel regenerierte Zellkulturen von WT,  $\Delta\text{ssaA}$  und  $\Delta\text{ssaA-C}$ , 4d nach Zugabe von Stickstoff.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum einen, dass *Synechocystis*-Zellen auch langanhaltende Stickstoffmangelbedingungen von bis 36 Tagen mit reduziertem Stoffwechsel überdauern können. Zum anderen wird deutlich, dass die zelluläre Adaptation unter langanhaltenden Stickstoffmangelbedingungen ohne 6S RNA im Vergleich zum Wildtyp-Stamm keine signifikanten Abweichungen aufweist.

### 3. Diskussion

#### 3.1. 6S RNA-Akkumulationsverhalten in *Synechocystis*

Die regulatorische Funktion von 6S RNA und ihr intrazelluläres Transkriptlevel stehen in Prokaryoten in direktem Zusammenhang zueinander. Für die 6S RNA des Proteobakteriums *E. coli*, welche als erste 6S RNA überhaupt identifiziert wurde (Hindley, 1967), wird das Expressionsmuster von einer Zunahme von zunächst niedrigen Transkriptmengen zu Beginn der Wachstumsphase bis hin zu zehnfach höheren Transkriptmengen zu Beginn der stationären Phase bestimmt (Wassarman & Storz, 2000). Dieser charakteristische Verlauf der 6S RNA-Transkriptakkumulation ist für viele Bakterienspezies zu beobachten (eine Übersicht ist in Burenina *et al.* (2015) dargestellt), jedoch sind auch abweichende Expressionsmuster bekannt. Demnach wurden u. a. für die 6S RNA aus *Salmonella enterica* (Ortega *et al.*, 2012) und *Helicobacter pylori* (Sharma *et al.*, 2010) eine über alle Wachstumsphasen hinweg gleichbleibend hohe Transkriptmenge nachgewiesen. Bei Betrachtung des 6S RNA-Expressionsmusters stellen Bakterienstämme, die zwei verschiedene 6S RNA-Kopien synthetisieren, eine Besonderheit dar, denn sie weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf. Für *B. subtilis* und *Legionella pneumophila* wurde gezeigt, dass sie eine 6S RNA-Kopie besitzen, die ihr Expressionsmaximum in der stationären Wachstumsphase hat (jeweils für die 6S-1 RNA der beiden Stämme beschrieben (Suzuma *et al.*, 2002; Trotochaud & Wassarman, 2005; Weissenmayer *et al.*, 2011)), während für die andere 6S RNA-Kopie entweder keine Veränderung in der Transkriptmenge (in *Legionella pneumophila* (Faucher *et al.*, 2010)) oder eine maximale Transkriptmenge in der exponentiellen Phase ermittelt wurde (6S-2 RNA aus *B. subtilis* (Ando *et al.*, 2002; Barrick *et al.*, 2005)).

Die bisherigen Analysen des 6S RNA-Transkriptlevels in Cyanobakterien ergaben vom charakteristischen *E. coli*-6S RNA-Expressionsmuster stark abweichende Ergebnisse. Wie von Watanabe *et al.* (1997) gezeigt wurde, geht die 6S RNA-Transkriptmenge in *Synechococcus* sp. PCC 6301 in der stationären Phase zurück. Auch für die 6S RNA von *Synechocystis* konnte dieses Muster anhand von Transkriptomstudien beobachtet werden (Kopf *et al.*, 2014; Mitschke *et al.*, 2011a).

Die in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zum wachstumsabhängigen 6S RNA-Expressionsmuster bestätigen die Beobachtung, dass die 6S RNA in *Synechocystis* hoch abundant ist und mit Erreichen der stationären Wachstumsphase eine leichte Abnahme der 6S RNA-Expression zu messen ist. Insgesamt ist jedoch von einem nahezu konstanten 6S RNA-Transkriptlevel auszugehen (Abbildung 2.1). Da unter photoheterotrophen Wachstumsbedingungen bereits während der exponentiellen Wachstumsphase ein deutlicher Rückgang der 6S RNA-Transkripte gemessen wurde (Abbildung 2.2), scheint die Wachstumsgeschwindigkeit und die Art der Energiegewinnung einen Einfluss auf die 6S RNA-Synthese zu haben (Heilmann *et al.*, 2017). Dabei sei angemerkt, dass die Analyse des 6S RNA-Transkriptionsmusters in *Synechococcus elongatus* PCC 6301 ebenfalls in Gegenwart einer exogenen Kohlenstoffquelle, in diesem Fall Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), durchgeführt

wurde (Watanabe *et al.*, 1997). Dass die 6S RNA-Expression von der Verfügbarkeit der jeweiligen Energiequelle abhängig sein kann, ist auch für den marinen Cyanobakterienstamm *Prochlorococcus marinus* bekannt. Für die zwei unterschiedlich langen 6S RNA-Transkripte wurde eine circadiane Fluktuation nachgewiesen (Axmann *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die cyanobakterielle 6S RNA in Bezug auf ihr Expressionsmuster kein Homolog zur *E. coli*-6S RNA darstellt. Daher ergibt sich die Frage, ob die für *E. coli* bekannte 6S RNA-abhängige Transkriptionsregulation auch in *Synechocystis* stattfindet und welche regulatorische Funktion die 6S RNA dabei allgemein übernimmt. Die beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die 6S RNA in *Synechocystis* eine andere physiologische Rolle einnimmt und möglicherweise hauptsächlich bei der Anpassung an Stressbedingungen beteiligt ist, wie u. a. für *Salmonella enterica* beschrieben wurde (Ren *et al.*, 2017).

### 3.2. 6S RNA - ein Regulator zur Anpassung an oxidativen Stress?

Cyanobakterien sind als photosynthetische Organismen auf eine effektive Regulierung des intrazellulären Netzwerks zur Anpassung an sich stetig ändernde Lichtintensitäten angewiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsanalysen auf Agar-Festmedium zeigten ein vermindertes Wachstum 6S RNA-defizienter Zellen, wenn sie in geringer Zelldichte aufgetragen wurden und somit hohen Lichtintensitäten ausgesetzt waren. Diese phänotypische Ausprägung wurde in Gegenwart von Glukose zusätzlich verstärkt (Abbildung 2.6). Aufschluss über den physiologischen Hintergrund der Lichtsensitivität von *ΔssaA* konnte die Verwendung von Na-Thiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) geben. Da der Effekt in Anwesenheit von Na-Thiosulfat etwas geringer ausfiel, liegt die Vermutung nahe, dass die phänotypische Ausprägung von *ΔssaA* unter dem Einfluss der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) entstanden und auf oxidativen Stress zurückzuführen ist. ROS, u. a. Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Hyperoxid-Anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), sind Nebenprodukte der Zellatmung und der oxygenen Photosynthese. Sie entstehen, wenn die einfallende Lichtintensität die zelluläre Kapazität des photosynthetischen Elektronenflusses übersteigt (Übersichtsartikel Latifi *et al.* (2009)). In Folge dessen kommt es zum Abbau des PSII und somit zur Inaktivierung der Photosynthese (Wang *et al.*, 2002), auch Photoinhibition genannt. Eine Anhäufung von ROS führt zu einer Inhibierung der *de novo* Synthese des D1 Proteins des PSII (Nishiyama *et al.*, 2004; Nishiyama *et al.*, 2001). Zum anderen inhibieren ROS den Energietransfer zwischen der Core-Untereinheit und dem terminalen Emitter der Phycobilisomen (Liu *et al.*, 2005). Na-Thiosulfat ist ein Reagenz, welches Wasserstoffperoxid neutralisiert und somit auch die Bildung weiterer ROS verhindert (Wang *et al.*, 2002). Unter photoheterotrophen Bedingungen, d.h. in Gegenwart von Licht und Glukose, finden Photosynthese und Atmung gleichzeitig in den Zellen statt, was zu einer Zunahme von NADPH und aufgrund dessen zur Bildung von ROS führen kann (Wang *et al.*, 2002). Dies erklärt, weshalb es in Gegenwart von Glukose zu einer deutlich stärkeren Ausprägung des Phänotyps in *ΔssaA* kam (Abbildung 2.6). Dass der Phänotyp durch Zugabe von Na-Thiosulfat nicht komplett aufgehoben wurde, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Konzentration an Na-Thiosulfat zur Neutralisierung der im Verlauf des Zellwachstums entstandenen Menge an ROS nicht ausgereicht hat. Weitere Analysen zur Lichtsensitivität von *ΔssaA*, die in Abwesenheit von Glukose durchgeführt

wurden, verdeutlichen, dass die Wachstumsinhibierung der Zellen auf Agar-Festmedium mit der einfallenden Lichtintensität korrelierte. Die Mutante zeigte bereits bei einer moderaten Lichtintensität von  $35 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ein deutliches Wachstumsdefizit, während sie sich bei  $10 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wie der Wildtyp-Stamm verhielt (Abbildung 2.7 D und E). Überraschenderweise konnte dieser Phänotyp für *ΔssaA* in Flüssigkulturen ohne Glukose nicht beobachtet werden (Abbildung 2.5 A und Abbildung 2.7 G). Jedoch konnte bei Wachstumsanalysen von Flüssigkulturen in Gegenwart von Glukose ebenfalls ein geringer Wachstumsnachteil von 6S RNA-defizienten Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 2.5 B). Dies zeigt, dass die Lichtsensitivität von *ΔssaA* in Gegenwart von Glukose verstärkt wurde. Dabei schien jedoch entscheidend zu sein, ob die Zellen einzeln in Flüssigkultur oder als Biofilm auf Agar-Festmedium vorlagen. Des Weiteren ist die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps in Flüssig- und Festmedium möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Lichtintensität durch Absorption des Lichtes in Flüssigkeit geringer ausfiel. Die hier aufgezeigten Untersuchungen machen deutlich, dass zwei unabhängige Umweltfaktoren auf das Wachstum der Zellen Einfluss nehmen; dies sind Licht und Kohlenstoff (in Form von Glukose). Die durch die beiden Faktoren ausgelösten intrazellulären Signale können sich gegenseitig potenzieren und zu einer vermehrten Bildung von ROS führen (Khan *et al.*, 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass 6S RNA an der Regulation des intrazellulären Netzwerkes zur Verarbeitung von Signalen, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden, beteiligt ist. 6S RNA scheint dabei insbesondere auf die Bildung von ROS Einfluss zu haben. Eine weitere Erklärung wäre, dass 6S RNA bei der Regulation der Verteidigungsmechanismen gegen oxidativen Stress eine aktivierende Rolle spielt. Bei diesen Verteidigungsmechanismen kommen u. a. Antioxidanzien zum Einsatz, die die Akkumulation von ROS verhindern. Dazu zählen neben nichtenzymatischen Antioxidanzien wie  $\alpha$ -Tocopherol und Carotinoide auch Enzyme wie Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen und Peroxidasen. Über das regulative Netzwerk der Stressantwort bei oxidativem Stress in Cyanobakterien ist bisher nur wenig bekannt. Erste Studien zeigen jedoch, dass in *Synechocystis* ein Ortholog des PerR Proteins (Li *et al.*, 2004), die FeSOD (Kim & Suh, 2005) sowie mehrere Histidinkinasen (Kanesaki *et al.*, 2007) als Sensoren und Regulatoren an der Koordinierung der Stressantwort beteiligt sein könnten (Übersichtsartikel Latifi *et al.* (2009)). Unter den Histidinkinasen befindet sich auch die Histidinkinase Hik34, deren Expression in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  schwach induziert wird (Kanesaki *et al.*, 2007). Eine weiterführende Diskussion zur möglichen Funktion von 6S RNA innerhalb des Hik34-Regulationsnetzwerkes ist in Abschnitt 3.5 beschrieben.

Interessanterweise haben Untersuchungen zur Funktion der 6S RNA in dem photosynthetischen  $\alpha$ -Proteobakterium *Rhodobacter sphaeroides* gegenteilige Ergebnisse ergeben. Demzufolge konnte bei dem Vergleich des Wildtyp-Stammes mit einer 6S RNA-defizienten Mutante weder eine Zu- oder Abnahme intrazellulärer ROS, noch eine Veränderung der Sensitivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder eine Zu- oder Abnahme der Photosynthesekomplexe nachgewiesen werden (Elkina *et al.*, 2017).

Auf der anderen Seite zeigen Untersuchungen von Axmann *et al.* (2007), dass sich das 6S RNA-Level in *Prochlorococcus* in Abhängigkeit des Tag-Nacht-Rhythmus verändert. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen 6S RNA und der Anpassung an hohe Lichtintensitäten in Cyanobakterien hin

und stützt die zuvor beschriebenen Beobachtungen zur 6S RNA als wichtiger Regulator molekularer Mechanismen gegen Photoinhibition und oxidativen Stress in *Synechocystis*. Auf welche Mechanismen die 6S RNA dabei im Einzelnen wirkt, lässt sich anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht vollständig beantworten. Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob der physiologische Phänotyp von  $\Delta ssaA$  tatsächlich auf eine Zunahme von ROS zurückzuführen ist, könnte z. B. eine Analyse der D1 Proteinmenge durchgeführt oder die Sauerstoffentwicklung *in vivo* ermittelt werden.

### 3.3. 6S RNA hat keinen Einfluss auf die Thermotoleranz gegenüber subletalen Temperaturen

Neben oxidativem Stress kann auch abiotischer Stress in Form von Hitze das Wachstumsverhalten von Cyanobakterien beeinflussen. Die optimale Wachstumstemperatur und die damit einhergehende maximale Wachstumsrate von *Synechocystis* ist abhängig von der Lichtintensität und Art der Begasung während der Kultivierung. Bei einer Belichtung mit Starklicht liegt die optimale Wachstumstemperatur zwischen 30 und 38 °C (Zavřel *et al.*, 2015). Die höchste Wachstumsrate wurde unter diesen Bedingungen bei 35 °C erreicht. Unter Normallichtbedingungen kann die maximale Wachstumsrate bei 30 °C erzielt werden (Inoue *et al.*, 2001). Die Stressantwort wird in *Synechocystis* meist durch einen kurzzeitigen Hitzeschock bei 43 °C oder mehr initiiert (Suzuki *et al.*, 2005; Tuominen *et al.*, 2006; Tuominen *et al.*, 2008). Für längerfristige Wachstumsanalysen wurden jedoch auch Kultivierungen bei der subletalen Temperatur von 40 °C vorgenommen (Fu & Xu, 2006; Tahara *et al.*, 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit bei 40 °C und Normallichtbedingungen durchgeführten Wachstumsanalysen der beiden 6S RNA-Mutanten  $\Delta ssaA$  und 6S(+) zeigen, dass die Zellen weder durch die Abwesenheit noch durch die Überexpression von 6S RNA einen Wachstumsvor- oder -nachteil hatten. Die Stämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm keine signifikanten Wachstumsunterschiede. Das Wachstumsmaximum wurde bei allen Stämmen nach drei Tagen erreicht, anschließend folgte die stationäre Phase (Abbildung 2.8). Somit ist kein direkter Einfluss der 6S RNA auf die Thermotoleranz der Zellen bei 40 °C zu erkennen. Die gewonnenen Daten weichen zum Teil von dem von Tuominen *et al.* (2006) beschriebenen Wachstumsverhalten des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes ab, wonach die Zellen erst nach vier Tagen Inkubation (bei 43 °C und Normallichtbedingungen) begannen abzusterben. In diesem Zusammenhang sei jedoch erwähnt, dass von dieser Arbeitsgruppe ein anderer glukosetoleranter, jedoch nicht motiler *Synechocystis* Wildtyp-Stamm für die Wachstumsanalyse verwendet wurde. Der direkte Vergleich unterschiedlicher Laborstämme des *Synechocystis*-Wildtyps ist vor dem Hintergrund, dass sich die Stämme genetisch unterscheiden (Trautmann *et al.*, 2012) unter Vorbehalt zu betrachten. Zudem können Abweichungen bei der Versuchsdurchführung, wie z. B. unterschiedliche Lichtintensitäten oder auch Unterschiede im Lichtspektrum der verwendeten Leuchtquellen zu abweichenden Ergebnissen führen.

In der Literatur gibt es bisher keinen Hinweis darauf, dass ein 6S RNA-Homolog aus anderen Bakterienstämmen eine regulatorische Funktion bei der Anpassung an Hitzestress übernimmt. Daher

war eine Verbindung in dieser Hinsicht bei Cyanobakterien nicht zwingend zu erwarten. Jedoch zeigen die in den Abschnitten 2.2.7.2.1 und 2.2.7.2.2 beschriebenen Ergebnisse zur Analyse des Einflusses von 6S RNA bei der Anpassung an Stickstoffmangel, dass die Expression des Gens *hik34* (kodiert für die Histidinkinase Hik34) in  $\Delta$ *ssaA* unter Stickstoffmangel und während der Regeneration hochreguliert ist. Hik34 fungiert zum einen als Regulator verschiedener Hitzeschockproteine (HSP) und zum anderen als Aktivator des Sigmafaktors SigB (Cervený *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2005). SigB ist wiederum ein wichtiger Regulator von *hspA* (kodiert für das HSP HspA) und ist entscheidend für die Anpassung der Zellen an kurze Hitzeperioden (Tuominen *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind während der Regeneration nach Stickstoffmangel in  $\Delta$ *ssaA* weitere Gene hochreguliert, die für die HSP, wie *hspG*, *groES*, *groEL1* und *groEL2* sowie *slr0170* (DnaK) kodieren (Tabelle 2.1). Vor diesem Hintergrund ist eine Funktion von 6S RNA innerhalb des Regulationsnetzwerks für die zelluläre Hitzestressantwort denkbar. Siehe dazu auch die Diskussion in Abschnitt 3.5. Zur Klärung dieser Vermutung sind weitere Analysen zum Verhalten der beiden 6S RNA-Mutanten  $\Delta$ *ssaA* und 6S(+) unter Hitzeeinwirkung notwendig. Da in dieser Arbeit die Thermotoleranz der Stämme bei einer subletalen Temperatur untersucht wurde, sollte als nächstes ein Hitzeschock bei 43°C für wenige Minuten mit anschließender Analyse der Viabilität der Zellen (z. B. durch Ermittlung der photosynthetischen Aktivität) sowie der Transkriptakkumulation wichtiger HSP-mRNAs (z. B. mittels qPCR oder Northern *Blotting*) getestet werden.

### 3.4. Die Rolle der 6S RNA bei der Anpassung an Stickstoffstress und anschließender Regeneration

Um ihr Überleben auch unter wechselnden Umwelt- und Nährstoffbedingungen zu ermöglichen sind Cyanobakterien in der Lage, sich mithilfe komplexer Anpassungsprozesse auf die jeweilige Situation einzustellen. Diese Prozesse unterliegen regulatorischen Netzwerken, die u. a. signalinduzierte und sRNA-vermittelte post-transkriptionelle Genregulation und die Aktivität alternativer Sigmafaktoren mit einbeziehen, und deren Auswirkung besonders in der Physiologie zum Ausdruck kommt (Los *et al.*, 2010; Schwarz & Forchhammer, 2005). Dass die 6S RNA in *Synechocystis* eine wichtige Rolle für eine schnelle Anpassung an verbesserte Nährstoffbedingungen - in diesem Fall Stickstoffverfügbarkeit - spielt, zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Physiologie, Genexpression und Sigmafaktor-Rekrutierung von  $\Delta$ *ssaA*, deren Ergebnisse auf den kommenden Seiten diskutiert werden.

#### 3.4.1. Einfluss auf physiologische und photosynthetische Parameter

Die bei der Anpassung an Stickstoffmangel ablaufenden metabolischen und physiologischen Prozesse sind für das Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 detailliert untersucht und beschrieben worden (Görl *et al.*, 1998). Ein Teil der physiologischen Umstrukturierungen führt zur Chlorose der Zellen und ist mit bloßem Auge erkennbar (Collier & Grossman, 1994). Zu Beginn dieser Arbeit waren

die physiologischen Abläufe, die während des Wiederanwachsens aus Stickstoffmangel in den Zellen vor sich gehen, hingegen weder für *Synechococcus* noch für *Synechocystis* im Detail bekannt.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen zeigen, dass es innerhalb der ersten drei Tage nach Stickstoffzugabe zu einer schrittweisen Wiederherstellung der Pigmentzusammensetzung sowie der photosynthetischen Aktivität kam. Zudem erfolgte der Abbau des unter Stickstoffmangel akkumulierten Reservestoffes Glykogen innerhalb der ersten 72h nach Stickstoffzugabe. Diese Beobachtungen decken sich sehr gut mit den von Klotz *et al.* (2016) und Spät *et al.* (2018) veröffentlichten Untersuchungen zu den physiologischen und photosynthetischen Parametern von regenerierenden *Synechocystis*-Zellen. Das Hauptaugenmerk der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse liegt jedoch darauf, welchen Einfluss und welche Bedeutung die 6S RNA für diesen Wiederherstellungsprozess hat. In 6S RNA-defizienten Zellen erfolgte die Wiederherstellung der für das Zellwachstum wichtigen physiologischen Prozesse mit einer Verzögerung von mehreren Stunden, was anhand eines länger andauernden Chlorose-Phänotyps optisch zu verfolgen war. Diese phänotypische Ausprägung ist auf eine Verzögerung der Phycobilisomen-Reassemblierung und Zunahme von Chl *a* in *ΔssaA* zurückzuführen und wurde anhand von Absorptionsspektren, Pigmentkonzentrationen (Abbildung 2.10) sowie den Fluoreszenzemissionsspektren bei 77 K (Abbildung 2.11) deutlich. Die Emissionsspektren von *ΔssaA* zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 580 nm ein verringertes Verhältnis des Emissionsmaximums von PSII CP47 (695 nm) zu CP43 (685 nm), was eine reduzierte Effizienz des Elektronentransfers in PSII erklären könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Assemblierung der PSII-Komplexe mit CP47 zu dem Zeitpunkt während der Regeneration noch unvollständig war (Spät *et al.*, 2018). Die Beobachtung, dass sich das Verhältnis des Emissionsmaximums von PSII CP47 (695 nm) zu CP43 (685 nm) im Laufe der Regeneration veränderte und dass es zunächst zu einer Zunahme der Emission von CP43 und im späteren Verlauf der Emission von CP47 kam, wurde ebenfalls von Spät *et al.* (2018) für den *Synechocystis*-Wildtyp beschrieben. Demzufolge spiegeln auch die Emissionsspektren die Verzögerung der Reassemblierung der Phycobilisomen und Photosynthesekomplexe in *ΔssaA* wieder. Der für *ΔssaA* ebenfalls ermittelte verlangsamte Abbau des zellulären Kohlenstoffs Glykogen (Abbildung 2.12) macht deutlich, dass die Abwesenheit von 6S RNA nicht nur auf den photosynthetischen Adaptationsprozess Einfluss hatte, sondern mit dem Glykogenkatabolismus auch andere entscheidende Anpassungsprozesse des Metabolismus an verbesserte Stickstoffbedingungen betroffen waren. Die hier gemachten Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die 6S RNA in *Synechocystis* auf globaler, übergeordneter Ebene Einfluss auf das Regulationsnetzwerks zur Anpassung an veränderte Stickstoffbedingungen nimmt. Zellen mit 6S RNA haben gegenüber 6S RNA-defizienten Zellen einen deutlichen Wachstumsvorteil, da sie in der Lage sind, vom stationären Zustand der Chlorose zum exponentiellen Wachstum schneller umschalten zu können.

Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die Überexpression von 6S RNA in *Synechocystis* keinen signifikanten Einfluss auf die Regeneration nach Stickstoffmangel hatte (Abbildung A.1 B). Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von 6S RNA-Überexpressionsmutanten in *E. coli* überein, für die ebenfalls keine Beeinträchtigung der Zellviabilität nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 1985).



Dies deutet darauf hin, dass 6S RNA innerhalb des Anpassungsprozesses an verbesserte Nährstoffbedingungen nicht als limitierender Faktor fungiert. Für eine beschleunigte Regeneration ist die Anwesenheit von 6S RNA zwar entscheidend - und vermutlich ist ein bestimmter Schwellenwert für einen 6S RNA-vermittelten Effekt erforderlich - jedoch ist die 6S RNA-Transkriptmenge jenseits dieses Wertes unerheblich.

### 3.4.2. Einfluss auf die Genexpression

#### 3.4.2.1 6S RNA zeigt geringen Effekt unter Stickstoffmangel – beschleunigt jedoch den Transkriptionswechsel während der Regeneration

Um zu untersuchen, ob sich der zuvor beschriebene Phänotyp von *ΔssaA* während der Regeneration nach Stickstoffmangel auch auf Transkriptebeine nachvollziehen lässt, war es zunächst entscheidend, die Genexpressionsmuster der beiden Stämme zum Ausgangszeitpunkt 0h +N, d.h. nach sieben Tagen unter Stickstoffmangel, zu betrachten. Mit nur 30 signifikant differentiell exprimierten proteinkodierenden Genen – dies entspricht weniger als 1 % aller proteinkodierender Gene – in *ΔssaA* zum Zeitpunkt 0h +N wird deutlich, dass 6S RNA in chlorotischen Zellen keinen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression hatte (Abbildung 2.13). Dies stimmt mit den Ergebnissen der physiologischen Untersuchungen überein, die gezeigt haben, dass sich die Pigmentzusammensetzung, die photosynthetische Aktivität und der Glykogengehalt von Wildtyp und 6S RNA-defizienten Zellen zum Zeitpunkt 0h +N nur geringfügig unterschied (Abbildung 2.10, Abbildung 2.11 und Abbildung 2.12). Aufgrund der geringen Differenz der beiden Stämme sowohl auf physiologischer als auch auf Expressionsebene nach sieben Tagen unter Stickstoffmangelbedingungen, konnte dieser Zeitpunkt als Referenz für die nachfolgenden Zeitpunkte herangezogen werden.

Vergleicht man die zuvor beschriebenen Ergebnisse für *Synechocystis* mit Daten für *E. coli* aus der Literatur, dann fällt auf, dass sich das Transkriptom von Wildtyp und 6S RNA-defizienten *E. coli*-Zellen während des stationären Wachstums stark unterscheidet. Demnach sind mehrere hundert Gene differentiell exprimiert. Bei einem  $\log_2$  *Foldchange* von  $\geq 1,5$  sind 148 Gene hoch- und 125 Gene runterreguliert (Neusser *et al.*, 2010). Dies stützt die Annahme, dass die 6S RNA in *Synechocystis* nicht von solch großer Bedeutung für die Anpassung der Genexpression bei Nährstoffmangelbedingungen ist, wie dies für die *E. coli*-6S RNA beschrieben wurde.

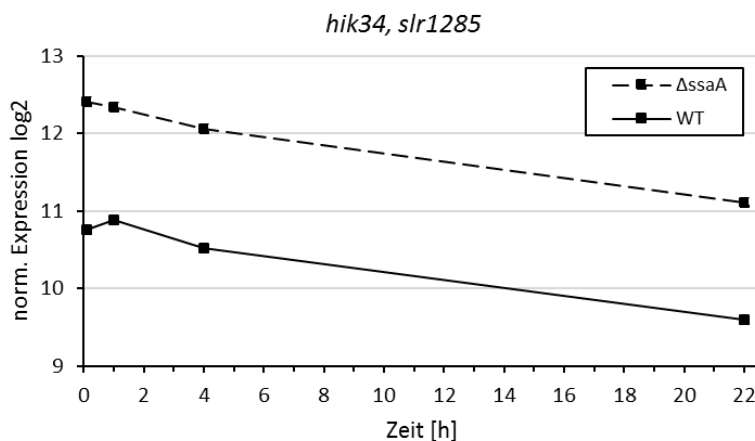
Auch wenn zum Zeitpunkt 0h +N nur wenige Gene differentiell exprimiert waren, so sind unter ihnen einige interessante Kandidaten vorhanden, für die sich eine genauere Betrachtung lohnt: Auf der einen Seite fällt auf, dass sich unter den negativ regulierten Transkripten in *ΔssaA* vier (*atp1*, *atpG*, *atpH* und *atpI*) von zehn ATP-Synthase-Genen befinden. In vergleichbaren Transkriptomstudien von Krasikov *et al.* (2012) und Klotz *et al.* (2016) wurde gezeigt, dass nach 96h bzw. 14d Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen alle ATP-Synthase-Gene im Wildtyp-Stamm runterreguliert sind. In *Synechocystis* liegen acht ATP-Synthase-Gene als *atp1*-Operon vor, wobei die in *ΔssaA* negativ regulierten Gene die ersten vier Gene des Operons bilden (Abbildung A.2 A). Auf der anderen Seite befinden sich unter den positiv regulierten Transkripten drei Proteine, die an der Biosynthese von

NAD(P)-Kofaktoren beteiligt sind: Nicotinamid-Mononucleotid-(NMN)Adenyltransferase (*slr0787*), Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (*slr0788*) und Quinolinatsynthase (*slr0622*, *nadA*) (Gerdes *et al.*, 2006). In den Transkriptomdaten von Krasikov *et al.* (2012) und Klotz *et al.* (2016) ist ein eindeutiger Trend der Genexpression dieser drei Gene unter Stickstoffmangelbedingungen jedoch nicht zu erkennen, was auf eine mögliche Regulation durch 6S RNA hindeuten könnte.

Die Expressionsanalyse der proteinkodierenden Gene in  $\Delta$ *ssaA* zu den Regenerationszeitpunkten 1h, 4h und 22h +N gibt Aufschluss über mehrere Aspekte: Bei Betrachtung der Verteilung der positiv und negativ regulierten Gene fällt auf, dass zu den frühen Zeitpunkten der Regeneration (1h und 4h +N) deutlich mehr Gene negativ als positiv exprimiert wurden. Zum späteren Regenerationszeitpunkt 22h +N waren hingegen mehr Gene hochreguliert (Tabelle 2.1). Dies verdeutlicht die Verzögerung der für den Regenerationsprozess entscheidenden Wiederherstellung der globalen Genexpression in  $\Delta$ *ssaA* im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Zudem lässt sich aus den Ergebnissen eine mögliche Abfolge der Expressionsinitiation funktioneller Gruppen für Wildtyp-Zellen ableiten: Während der frühen Regenerationsphase wurde die Synthese relevanter Gene der ATP-Synthase sowie der ribosomalen Proteine induziert. Zeitlich versetzt wurde die Synthese von Genen des PSI und PSII sowie der Phycobilisomen initiiert (Abbildung 2.14 B, C und D). Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten einer vergleichbaren Transkriptomanalyse des *Synechocystis* Wildtyp-Stammes von Klotz *et al.* (2016) überein. Die Autoren unterteilen den Regenerationsprozess nach Stickstoffmangel in zwei Phasen: In der ersten Phase (Phase I) werden zentrale zelluläre Prozesse angesteuert, die für die Reaktivierung der Proteinbiosynthese von Bedeutung sind. Dazu gehören ATP-Synthase, Glukosemetabolismus, RuBisCo, Stickstoffassimilierung, Sulfatassimilierung zur Synthese der Aminosäuren Methionin und Cystein sowie ribosomale Proteine. In der zweiten Phase (Phase II) werden alle erforderlichen Komponenten zum Wiederaufbau der Photosynthese-Komplexe reaktiviert. Zu diesen Genclustern gehören Gene des PSI, PSII und der Phycobilisomen (Klotz *et al.*, 2016). Überträgt man diese Aufteilung auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Expressionsdaten, so wird eine Verzögerung der Synthese von Phase I und Phase II Genen in  $\Delta$ *ssaA* ersichtlich. Daraus lässt sich außerdem schließen, dass in Abwesenheit von 6S RNA nicht nur einzelne Gengruppen verspätet exprimiert werden, sondern dass die gesamte Expressionsmaschinerie verzögert initiiert wird. 6S RNA wirkt daher nicht spezifisch auf einzelne Gencluster, sondern vielmehr global auf die Transkription. Dies spiegelte sich zudem in den verzögert eintretenden physiologischen Prozessen, wie der Assemblierung der Phycobiliproteine, der photosynthetischen Aktivität und dem Glykogenabbau wieder (Abbildung 2.10, Abbildung 2.11 und Abbildung 2.12).

Besonders auffällig ist das Expressionsmuster des Gens *slr1285* (*hik34*), welches für die Signaltransduktions-Histidinkinase 34 (Hik34) kodiert. Die Transkriptomdaten zeigen, dass die Expression von *hik34* unter Stickstoffmangel sowohl in Wildtyp- als auch in  $\Delta$ *ssaA*-Zellen hochreguliert war. Beim direkten Vergleich der beiden Stämme jedoch fällt auf, dass *hik34* in  $\Delta$ *ssaA* unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration hochreguliert war (Abbildung 3.1, Heilmann *et al.* (2017)). Zudem waren mehrere Hitzeschockgene, u. a. *dnak*, *dnaJ*, *groEL-1*, *groEL-2*,

*groES* und *htpG* unter Stickstoffmangelbedingungen und/oder während der Regeneration in 6S RNA-defizienten Zellen hochreguliert. In der Literatur sind dazu Daten mit z. T. konträren Ergebnissen zu finden: Während in den Transkriptomdaten von Krasikov *et al.* (2012) sowohl *hik34* als auch alle Hitzeschockgene unter Stickstoffmangelbedingungen und stickstoffkomplementierten Bedingungen runterreguliert sind, zeigen *hik34* und einzelne Hitzeschockgene in den Daten von Klotz *et al.* (2016) keine signifikanten Expressionsänderungen, während andere Hitzeschockgene zum Zeitpunkt 14d -N und/oder während der Regeneration vermehrt exprimiert werden. Eine weiterführende Erörterung zur möglichen Interaktion von 6S RNA und Hik34 ist in Abschnitt 3.5 zu finden.



**Abbildung 3.1 Zeitlicher Verlauf der Transkriptakkumulation von *hik34* während der Regeneration nach Stickstoffmangel.** Aufgetragen sind die normierten Expressionsdaten von *hik34* (*slr1285*) aus der vergleichenden Microarray-Analyse des *Synechocystis* WT-Stammes und der  $\Delta$ *ssaA*-Mutante gegen die Zeit (0h, 1h, 4h und 22h +N).

Bei Betrachtung der Transkriptomdaten von  $\Delta$ *ssaA* fällt außerdem eine Besonderheit auf: Proteine, die an der Stickstoffassimilierung beteiligt sind und durch den globalen Stickstoffregulator NtcA reguliert werden (u. a. *amt1*, *nirA*, *nirB*, *sigE*, *nrtA*, *nrtB*, *moaA* (Giner-Lamia *et al.*, 2017)), wiesen in  $\Delta$ *ssaA* keine signifikanten Expressionsunterschiede auf (Abschnitt 2.2.7.2.5), obwohl sie unter Stickstoffmangel einheitlich reprimiert werden (Klotz *et al.*, 2016; Krasikov *et al.*, 2012). Darüber hinaus gab es keine signifikanten Unterschiede in der Transkription der Stickstoffregulatoren NtcA, NtcB, P-II, GlnB, PphA und RsbU in  $\Delta$ *ssaA*. Diese Beobachtung zeigt zum einen, dass die Abwesenheit von 6S RNA keinen Einfluss auf das NtcA-Regulon hat. Zum anderen verläuft die Regeneration in 6S RNA-defizienten Zellen trotz des im gleichen Umfang regulierten NtcA-Netzwerks verzögert ab. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die 6S RNA-abhängige Transkriptionsregulation unabhängig des NtcA-Regulons stattfindet. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die 6S RNA auf späterer, vermutlich post-transkriptioneller Ebene die Regeneration der Zellen beeinflusst, unabhängig der vorliegenden NtcA-Menge. Diese Beobachtungen deuten außerdem auf eine möglicherweise entscheidende Erklärung hin: Die 6S RNA-abhängige (Transkriptions-)Regulation ist nicht spezifisch für die Stressantwort auf wechselnde Stickstoffverfügbarkeit, sondern sie ist vielmehr eine allgemeine Stressantwort zum Wiederaufwachen

aus Nährstoffmangelbedingungen. Dies würde bedeuten, dass dieser Effekt auch unter anderen Stressbedingungen aufträte, bei denen die Zellen einen vergleichbaren stationären Zustand erreichten. Diese Theorie könnte mittels Wachstumsanalysen unter diversen Stressbedingungen überprüft werden. Dafür empfiehlt es sich, *ΔssaA*- und Wildtyp-Zellen z. B. unter Phosphat- oder Eisenmangel zu setzen und anschließend zu untersuchen, ob die Stämme Unterschiede in ihrem Regenerationsverhalten aufweisen.

#### 3.4.2.2 Die Rolle der sRNAs und das regulatorische Potenzial von SyR11

Neben den proteinkodierenden Genen befindet sich unter den differentiell exprimierten Transkripten in *ΔssaA* auch eine große Anzahl an sRNAs und asRNAs. Diese machten zum Zeitpunkt 0h +N unter den negativ regulierten Transkripten und während der Regeneration unter den negativ und positiv regulierten Transkripten die Mehrheit aus (Abbildung 2.13). Daran ist zu erkennen, welche große Bedeutung ihr regulatorisches Potential bei der Anpassung an wechselnde Umwelteinflüsse hat. Unter den in *ΔssaA* signifikant reprimierten Transkripten befanden sich u. a. die sRNAs SyR47 (*ncr1080*), die unter Stickstoffmangelbedingungen stark reprimiert war und direkt *upstream* des an der Zellteilung beteiligten Proteins NlpD (*slr0993*; Stohl *et al.* (2016)) liegt, und SyR49 (*ncr0910*), deren Transkriptlevel in Wildtyp-Zellen bei wechselnden Stickstoffbedingungen nahezu konstant bleibt (Klotz *et al.*, 2016). Da bisher nur für einen sehr geringen Anteil aller sRNAs eine regulatorische Funktion bekannt ist, ist eine genaue Zuordnung ihrer Funktion innerhalb des Stickstoff-Regulationsnetzwerks nahezu unmöglich. Darüber hinaus fällt auf, dass einige bereits charakterisierte sRNAs, die laut Literatur unter wechselnden Wachstums- und Stressbedingungen z. T. divergente Expressionsmuster aufweisen, in *ΔssaA* nicht signifikant differentiell exprimiert waren. Dazu gehören u. a. PmgR1 (Regulation der Glykogenakkumulation; de Porcellinis *et al.* (2016)), NsiR4 (Regulation der Stickstoffassimilierung; Klähn *et al.* (2015)) und PsrR1 (Regulation photosynthetischer Funktionen zur Anpassung an wechselnde Lichtintensitäten; Georg *et al.* (2014)).

Die stärkste und auffälligste Abweichung zeigte in der vorliegenden Arbeit die Akkumulationskinetik der regulatorischen sRNA SyR11 (*ncr1160*). In Wildtyp-Zellen waren SyR11-Transkripte hoch abundant. Unter Stickstoffmangelbedingungen ging das Transkriptlevel zurück und nahm bereits 1h nach Stickstoffzugabe wieder zu. In *ΔssaA* lag das SyR11-Transkriptlevel sowohl unter Standard- als auch unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration unterhalb der ermittelten Werte von Wildtyp-Zellen (Abbildung 2.14 F und Abbildung 2.16). Die Beobachtungen der *Microarray*-Analyse konnten mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden. Die Ergebnisse lassen zunächst darauf schließen, dass SyR11 in Abhängigkeit von 6S RNA möglicherweise eine regulatorische Funktion bei der schnellen Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen, wie in diesem Fall wechselnde Stickstoffverfügbarkeit, übernimmt. Dafür sprechen auch bisher unveröffentlichte Daten von Herrn Dr. Dennis Dienst, die zeigen, dass die 90 nt lange SyR11 vermutlich an der posttranskriptionellen Aktivierung der Genexpression von *sigE* beteiligt ist (Heilmann *et al.*, 2017). Der Sigmafaktor SigE wiederum ist ein wichtiger Regulator für die Anpassung an Stickstoffstress, demnach ist die Expression

von *sigE* unter Stickstoffmangel stark hochreguliert (Muro-Pastor *et al.*, 2001). Mithilfe von *Microarray*-Analysen konnte außerdem ein Rückgang der SyR11-Transkripte unter Starklichtbedingungen sowie unter Kohlenstoffmangel gezeigt werden (Mitschke *et al.*, 2011b). Hingegen wurde in der Transkriptomanalyse von Klotz *et al.* (2016) in *Synechocystis* Wildtyp-Zellen weder unter Stickstoffmangelbedingungen noch während der Regeneration eine signifikante Ab- oder Zunahme von SyR11-Transkripten ermittelt. Dies spricht gegen eine spezifische Funktion von SyR11 bei der Anpassung an Stickstoffstress, bestärkt jedoch die Annahme, dass die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen des SyR11-Transkriptlevels auf den Einfluss von 6S RNA zurückzuführen sind. 6S RNA ist folglich ein positiver Regulator der SyR11-Synthese. Um die Funktionsweise von SyR11 und ihre Wechselwirkung mit 6S RNA innerhalb des Netzwerks der (Stickstoff)-Transkriptionsregulation besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen, wie z. B. *in vitro*-Transkriptions- und Bindestudien, und die Analyse des Wachstumsverhaltens sowie der Genexpression von 6S RNA-SyR11-Mutanten (Doppeldeletions- und Komplementationsmutanten) notwendig.

### 3.4.3. Einfluss auf die Genexpression, Rekrutierung und Proteingehalt der Sigmafaktoren

Die zelluläre Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen erfolgt in Cyanobakterien über eine veränderte Transkriptionsaktivität die maßgeblich durch die Sigmafaktoren der Gruppe 1 und 2 reguliert wird. Aus *E. coli* ist bekannt, dass es zu Beginn der stationären Wachstumsphase zur Komplexbildung zwischen 6S RNA und dem  $\sigma^{70}$ -RNAP-Holoenzym kommt, wodurch die Transkription  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren inhibiert und die Transkription  $\sigma^S$ -abhängiger Promotoren aktiviert wird (Trotochaud & Wassarman, 2004). Demzufolge und vor dem Hintergrund, dass die cyanobakterielle 6S RNA strukturell und funktionell dem Homolog aus *E. coli* ähnelt (Rediger *et al.*, 2012), wurde zu Beginn der Arbeit die These aufgestellt, dass 6S RNA auch in *Synechocystis* die Aktivität der Sigmafaktoren beeinflusst.

Aus den Expressionskinetiken der einzelnen Sigmafaktoren des Wildtyp-Stammes wird zunächst ersichtlich (abgebildet in Heilmann *et al.* (2017)), dass es unter Stickstoffmangelbedingungen zu einem Rückgang und nach Stickstoffzugabe zu einer Zunahme der *sigA*-Transkripte kam. Dem entgegengesetzt verliefen die Expressionsprofile der Sigmafaktoren der Gruppen 2 und 3. Die Profile entsprechen damit dem beobachteten Verlauf der transkriptionellen und physiologischen Antwort der Zellen auf verfügbaren Stickstoff und sind identisch mit den Ergebnissen vergleichbarer Transkriptomstudien (Klotz *et al.*, 2016; Krasikov *et al.*, 2012). Der Vergleich der Genexpressionsmuster der Sigmafaktoren von Wildtyp und  $\Delta$ *ssaA* zeigt, dass die Sigmafaktoren SigA, SigB-F und SigH in  $\Delta$ *ssaA* nicht differentiell exprimiert waren (Abbildung 2.15). Dies lässt zunächst vermuten, dass die Genexpression der Sigmafaktoren 6S RNA-unabhängig ist. Eine Ausnahme bildet die Expression von *sigG*, die in  $\Delta$ *ssaA* während der Regenerationszeitpunkte signifikant runterreguliert war (Abbildung 2.15). Auf der anderen Seite ist anhand des zeitlichen Verlaufs des Genexpressionsprofils von *sigA* zu erkennen, dass die *sigA*-Transkriptionsinitiation in 6S RNA-defizienten Zellen verzögert stattgefunden

hat (Heilmann *et al.*, 2017). Dies spricht dafür, dass 6S RNA eine wichtige Rolle beim schnellen Wechsel von stressinduzierter Genexpression, in Abhängigkeit der Gruppe 2 Sigmafaktoren, hin zu SigA-abhängiger Genexpression spielt. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der *in vivo* Analyse, die den Proteingehalt sowie die Rekrutierung der einzelnen Sigmafaktoren durch die RNAP dokumentiert (Abbildung 2.18 und Abbildung 2.19). Demnach erfolgte die Zunahme von SigA-assoziierten RNAP-Holoenzymen in Wildtyp-Zellen nach Stickstoffzugabe schneller als in  $\Delta ssaA$ . Dies deutet auf eine aktivierende Funktion von 6S RNA auf die SigA-Rekrutierung hin. In Übereinstimmung mit den Daten der *Microarray*-Analyse, die unter Stickstoffmangelbedingungen nur geringe Unterschiede im Transkriptom von Wildtyp-Zellen und  $\Delta ssaA$  zeigten, war zum Zeitpunkt 0h +N in beiden Stämmen nahezu einheitlich eine starke Reduzierung der SigA-RNAP-Komplexe zu erkennen (Abbildung 2.18 A). Daher ist zu vermuten, dass 6S RNA nicht der alleinige Faktor für die Bildung von SigA-RNAP-Komplexen ist und dass weitere Regulationsmechanismen für die Rekrutierung von SigA durch die RNAP verantwortlich sind.

Die Sigmafaktoren der Gruppe 2 sind in *Synechocystis* für die Anpassung an Stickstoffmangel zwar nicht essentiell, jedoch sind Zellen, in denen alle Sigmafaktoren der Gruppe 2 deletiert sind, sensibler gegenüber Stickstoffmangel und außerdem nicht imstande zu regenerieren (Antal *et al.*, 2016). Darüber hinaus sind die Sigmafaktoren der Gruppe 2 in Kooperation mit SigA an der Regulierung der NtcA-abhängigen Genexpression beteiligt (Imamura *et al.*, 2006). Wie die in der vorliegenden Arbeit gezeigte *in vivo* Analyse ergab, kam es während der frühen Regenerationszeitpunkte 1h +N und 4h +N in Wildtyp-Zellen zu einer Zunahme der SigB-RNAP-Komplexe (Abbildung 2.19 A). Demnach scheint SigB in der frühen bis mittleren Phase der Regeneration eine wichtige Rolle zu spielen. Während Zellen ohne SigB bei der Anpassung an verschiedene Stressbedingungen, wie Salz (Nikkinen *et al.*, 2012) und Hitze (Tuominen *et al.*, 2006) verminderte Viabilität zeigten, war  $\Delta sigB$  dazu im Stande, sich ebenso wie der Wildtyp an Stickstoffmangelbedingungen anzupassen (Antal *et al.*, 2016). Wie entscheidend und umfassend der Einfluss von SigB bei der Regeneration aus Stickstoffmangel ist, lässt sich abschließend nicht eindeutig bestimmen.

Im Vergleich zu SigB wurde SigC bereits unter Stickstoffmangel sowie während der frühen Regenerationszeitpunkte 1h +N und 4h +N rekrutiert (Abbildung 2.19 C). SigC könnte demnach bei der Anpassung und dem Überdauern der stressbedingten Chlorose beteiligt sein (Heilmann *et al.*, 2017). Es war bereits bekannt, dass SigC die Transkription wichtiger Stickstoffgene reguliert und für die Anpassung an Stickstoffmangelbedingungen entscheidend ist (Asayama *et al.*, 2004). Antal *et al.* (2016) konnten zudem nachweisen, dass  $\Delta sigBDE$ -Zellen, die SigC als einzigen funktionellen Sigmafaktor der Gruppe 2 besitzen, nach Stickstoffmangel nur mit deutlicher Verzögerung wieder anwachsen. Vor diesem Hintergrund stellen die Autoren die Hypothese auf, dass SigC den physiologischen Zustand der Chlorose nach Zugabe von Stickstoff aufrechterhält (Antal *et al.*, 2016). Übertragen auf die Ergebnisse zur Rekrutierung von SigC durch die RNAP bedeutet dies, dass eine vermehrte SigC-RNAP-Komplexbildung in  $\Delta ssaA$  die Zellen an einem schnellen Umschalten zum exponentiellen Wachstum hindert. Die Abwesenheit von 6S RNA führte sowohl bei SigB als auch bei SigC zu einer verstärkten

Komplexbildung mit der RNAP während der frühen Regenerationsphase (1h und 4h +N). Dies deutet darauf hin, dass 6S RNA die Komplexbildung von SigB und SigC mit der RNAP limitiert.

Der Gehalt und die Rekrutierung von SigD durch die RNAP konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von zu schwachen Bandenintensitäten bei der Immunoblot-Analyse nicht untersucht werden. Die Expressionsdaten von *sigD* lassen darauf schließen, dass 6S RNA keinen bedeutenden Einfluss auf die Synthese von SigD bei der Anpassung an wechselnde Stickstoffbedingungen hat (Abbildung 2.15). Antal *et al.* (2016) haben jedoch gezeigt, dass SigD für die Anpassung an Stickstoffmangel von Bedeutung ist und äußern die Vermutung, dass eine aktivierende Wirkung von SigD auf Antioxidanzien (*ROS-scavenging systems*) dahintersteht.

Die Expression von SigE war unter Stickstoffmangelbedingungen hochreguliert und ging nach Zugabe von Stickstoff leicht zurück (Heilmann *et al.*, 2017). Dabei unterschied sich der Expressionsverlauf zwischen Wildtyp- und *ΔssaA*-Zellen kaum voneinander (Abbildung 2.15). Vor dem Hintergrund, dass die Expression von *sigE* durch den Stickstoffregulator NtcA reguliert wird (Muro-Pastor *et al.*, 2001) und dessen Expressionsverlauf sowie weitere NtcA-regulierte Transkripte in *ΔssaA* und Wildtyp-Zellen ebenfalls kaum Abweichungen aufwiesen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Dies ist ein weiterer Nachweis dafür, dass die 6S RNA keinen direkten Einfluss auf das globale NtcA-Transkriptionsnetzwerk nimmt. Auch der SigE-Proteingehalt, der unter Stickstoffmangel und während der frühen Regenerationsphase anstieg, war in beiden Stämmen nahezu identisch (Abbildung 2.19 F). Allerdings war die Rekrutierung von SigE durch die RNAP zum Zeitpunkt 1h +N in Abwesenheit von 6S RNA weniger effektiv (Abbildung 2.19 E). SigE aktiviert die Expression von *glgX* (Glykogenisoamylase) und *glgP* (Glykogenphosphorylase) (Osanai *et al.*, 2005). Da beide Enzyme für den Abbau von Glykogen verantwortlich sind (Ball & Morell, 2003), steht die verminderte Rekrutierung von SigE möglicherweise mit dem verzögerten Glykogenabbau in *ΔssaA* in Zusammenhang.

Bei den Genexpressionsprofilen der Sigmafaktoren der Gruppe 3 (SigF, SigG, SigH) sticht die Kinetik von *sigG* mit einem deutlichen Rückgang der Genexpression nach Zugabe von Stickstoff hervor (Heilmann *et al.*, 2017). Zudem war die Genexpression in *ΔssaA* während der Regenerationsphase signifikant runterreguliert (Abbildung 2.15). SigG gehört zu den ECF-Sigmafaktoren (*extracytoplasmic function*) und ist für das Wachstum unter Standardbedingungen essentiell. Die Expression von *sigG* ist unter Stressbedingungen runterreguliert (Huckauf *et al.*, 2000). Zudem wurde auch von Klotz *et al.* (2016) ein signifikanter Rückgang der Expression insbesondere während der frühen Regenerationsphase nach Stickstoffmangel (4h +N und 12h +N) beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass SigG an der Adaptation der Genexpression an wechselnde Stickstoffverfügbarkeit im Zusammenspiel mit SigA, SigB und SigC beteiligt ist. Die niedrigen Expressionswerte in *ΔssaA* weisen möglicherweise auch hierbei auf eine regulatorische Funktion von 6S RNA beim schnellen Wechsel der Genexpression während der Regeneration hin.

Zusammenfassend verdeutlichen die Analysen, dass 6S RNA die Expression und den intrazellulären Proteingehalt der Gruppe 1 und 2 Sigmafaktoren und von SigG sowie ihre Rekrutierung durch die RNAP beeinflusst. Dabei scheint weniger die Expressionsrate und demzufolge der Gehalt der Sigmafaktoren,

sondern vielmehr die Rekrutierung der Sigmafaktoren durch die RNAP auf Regulation durch 6S RNA zurückzuführen sein. Insgesamt wird deutlich, dass 6S RNA den Wechsel der stressbedingten Genexpression, hier vor allem in Abhängigkeit von SigB und SigC, hin zur SigA-abhängigen Genexpression von Haushaltsgenen beschleunigt. Weitere Untersuchungen zur Interaktion und Funktionsweise von 6S RNA, den Sigmafaktoren sowie der RNAP in Form von *in vitro* Transkriptions- und Bindestudien sind erforderlich, um die einzelnen Beziehungen der (Transkriptions-)Faktoren innerhalb des Transkriptionsnetzwerks zu beleuchten.

#### 3.4.4. Hohe Konstanz des 6S RNA-Transkriptlevels unter Stickstoffstress

Neben der Rekrutierung der Sigmafaktoren kann auch das 6S RNA-Transkriptlevel Aufschluss über die Rolle des Riboregulators bei der Anpassung an Stickstoffstress geben. Der Verlauf der 6S RNA-Transkriptakkumulation deutet zunächst auf eine Zunahme der Transkripte unter Stickstoffmangel um bis zu 50 % hin (Abbildung 2.20). Allerdings ist auch bekannt, dass die Menge ribosomaler RNAs unter Stickstoffmangelbedingungen stark zurückgeht (Klotz *et al.*, 2016; Sauer *et al.*, 2001). Dieser Aspekt ist für die Deutung des Verlaufs der 6S RNA-Transkriptakkumulation von entscheidender Bedeutung, da die 6S RNA-Transkriptmenge auf die 5S rRNA-Transkriptmenge normiert wurde. Eigene Beobachtungen haben gezeigt, dass sich das Verhältnis der ribosomalen RNAs untereinander verschiebt, wobei besonders die 23S und 16S rRNA unter Stickstoffmangel abgebaut werden (Daten nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass sich der Anteil von 5S rRNA- und 6S RNA-Transkripten im Verhältnis zur Gesamt-RNA unter Stickstoffmangelbedingungen verändert hat. Bei der in Abbildung 2.20 gezeigten Analyse wiesen die 5S rRNA-Transkriptmengen nur geringe Schwankungen auf, ohne eindeutigen Trend. Ob und inwieweit sich die 5S rRNA-Transkriptmenge verändert hat, lässt sich abschließend nicht eindeutig sagen. Wenn jedoch davon auszugehen ist, dass es bei der hier durchgeführten Analyse ebenfalls zu einem leichten Rückgang der 5S rRNA-Transkripte gekommen ist, dann bedeutet dies, dass sich zum einen das Verhältnis von 5S rRNA und 6S RNA verändert hat und dass zum anderen die tatsächliche 6S RNA-Transkriptakkumulation geringer ausfiel als die Daten vermuten lassen.

Angenommen, die 6S RNA-Transkriptmenge hat sich bei wechselnden Stickstoffbedingungen ggfs. nur minimal verändert, welche Bedeutung hat das für die Funktionsweise der 6S RNA in *Synechocystis*? Die Überlegung lässt die Schlussfolgerung zu, dass der aus *E. coli* und aus *B. subtilis* (für 6S-1 RNA) bekannte 6S RNA-abhängige Mechanismus der Transkriptionsregulation, der auf einer Zunahme des 6S RNA-Levels und der Bildung von SigA-RNAP-6S RNA-Komplexen beruht, im Fall von *Synechocystis* nicht gilt. Vielmehr scheint hier ein anderer Mechanismus als Grundlage der 6S RNA-abhängigen Transkriptionsregulation zu dienen, der nicht primär über die 6S RNA-Transkriptakkumulation gesteuert wird. Dies deckt sich außerdem mit der in der Literatur für *Synechococcus* sp. PCC 6301 beschriebenen Abnahme der 6S RNA-Transkripte während der stationären Phase (Watanabe *et al.*, 1997). Der physiologische Zustand der Zellen während der Chlorose und während der stationären Wachstumsphase weist einige Parallelen auf. Zudem sind die Zellen imstande, aus beiden stationären Zuständen zu regenerieren. Daher könnte beiden Konditionen eine einheitliche oder ähnlich



verlaufende 6S RNA-Transkriptionsregulation zu Grunde liegen, für die eine Akkumulation der 6S RNA-Transkripte nicht essentiell ist.

#### 3.4.5. Kein Nachweis *in vivo*-generierter pRNA-Transkripte – daher auch keine Synthese?

Ein wichtiger Aspekt der 6S RNA-abhängigen Transkriptionsregulation in Bakterien ist die Synthese von pRNA-Transkripten, die eine Umstrukturierung der 6S RNA-Sekundärstruktur und schließlich die Dissoziation der 6S RNA-RNAP-Komplexe zur Folge hat. In *E. coli* und *B. subtilis* (6S-1 RNA) findet die pRNA-Synthese primär wenige Minuten nach Initiation des *Outgrowth* aus der stationären Phase durch Zugabe von NTPs statt (Beckmann *et al.*, 2011; Wurm *et al.*, 2010). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob während der Regeneration nach Stickstoffmangelbedingungen in *Synechocystis*-Zellen ebenfalls eine 6S RNA-abhängige Synthese von pRNAs erfolgt. Ein Nachweis von *in vivo* generierten pRNA-Transkripten mittels Northern Blot-Analyse war in diesem Fall nicht erfolgreich (Abbildung 2.21). Bei der Analyse kam eine RNA-LNA-Sonde zum Einsatz, um die Affinität zu den pRNA-Transkripten zu verstärken. Außerdem wurden pro Gelspur jeweils 15 µg Gesamt-RNA aufgetragen, um auch geringe Transkriptmengen detektieren zu können. Dass die pRNA-Transkripte trotz dieser nach Hoch *et al.* (2016) optimierten Methode nicht nachgewiesen werden konnten spricht zunächst dafür, dass zu den untersuchten Zeitpunkten tatsächlich keine pRNA-Transkripte synthetisiert vorlagen. Es lässt sich aber nicht vollständig ausschließen, dass pRNA-Transkripte möglicherweise doch vorhanden waren, die pRNA-Transkriptmenge jedoch unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lag. Eine Verwendung anderer, sensitiverer Nachweismethoden könnte hier Aufschluss geben. Dazu gehören z. B. die Illumina RNA-Sequenzierung und eine neuartige Primer Extension-Methode, die von Hoch *et al.* (2016) erfolgreich für den Nachweis von pRNA-Transkripten der 6S-2 RNA aus *B. subtilis* verwendet wurden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Detektion nicht erfolgte, da die pRNA-Transkripte für eine stabile Hybridisierung mit der Sonde zu kurz waren. Denn die Effektivität der Detektion von pRNAs mittels Northern *Blotting* geht mit abnehmender pRNA-Transkriptlänge zurück (Hoch *et al.*, 2016). Möglich wäre zudem, dass die pRNA-Synthese zu einem anderen als den hier ausgewählten Zeitpunkten aufgetreten ist. Während die pRNA-Synthese in *E. coli* im Zuge des *Outgrowth* innerhalb weniger Minuten stattfindet und pRNA-Transkripte daher nur innerhalb der ersten 10 min nachweisbar sind (Wurm *et al.*, 2010), vollzieht sich die RNA-Synthese in *Synechocystis* in Abhängigkeit der jeweiligen Stresssituation innerhalb weniger Minuten (García-Domínguez *et al.*, 2000) bis hin zu mehreren Stunden (Hagemann *et al.*, 1994). Daher wurden in dieser Arbeit mit 0,5h, 1h, 2h, 3h +N, etc. größere Zeitabstände ausgewählt. Im Hinblick auf das unter Stickstoffmangelbedingungen sowie unter stationären Wachstumsbedingungen nahezu konstant bleibende 6S RNA-Transkriptlevel (Abbildung 2.20) ist außerdem denkbar, dass die pRNA-Synthese während einer anderen Phase des zellulären Wachstums auftritt. Für die 6S-2 RNA aus *B. subtilis*, die während der exponentiellen Wachstumsphase akkumuliert, wurden pRNA-Transkripte für ebenjene frühe Wachstumsphase *in vivo* nachgewiesen (Hoch *et al.*, 2016). Dieses Szenario ist auch für die 6S RNA aus *Synechocystis* vorstellbar. Da bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probe

von exponentiell wachsenden Zellen mit einer  $OD_{750nm}$  von 0,6 - 0,7 (Abbildung 2.21, Probe: Std) keine pRNA-Detektion erfolgte, sollten bei zukünftigen Analysen Proben aus früheren und späteren Zeitpunkten des exponentiellen Wachstums hinzugezogen werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob die 6S RNA aus *Synechocystis* grundsätzlich als *Template* für die pRNA-Synthese dienen kann und, ob von einer tatsächlich vorkommenden pRNA-Synthese auszugehen ist, lohnt sich ein Blick in die Literatur. Für die Hypothese, dass die Synthese von pRNA-Transkripten in *Synechocystis* stattfindet, sprechen zum einen die Ergebnisse aus *in vitro*-Transkriptionsstudien mit cyanobakterieller 6S RNA und *E. coli* RNAP. Demnach konnte die Komplexbildung von cyanobakterieller 6S RNA und *E. coli*-RNAP sowie die Synthese von bis zu 30 nt langen pRNA-Transkripten gezeigt werden (Rediger *et al.*, 2012). Zum anderen wurde von Mitschke *et al.* (2011b) der pRNA-Transkriptionsstart in *Synechocystis* ermittelt. Ein Nachweis von pRNA-Transkripten in *Synechocystis*-Zellen, die unter vier verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden (Standardwachstum bis  $OD_{750nm}$  0,6 bei  $50 \mu mol Photonen m^{-2} s^{-1}$ ; Dunkelheit für 1h; Starklicht für 30 min bei  $500 \mu mol Photonen m^{-2} s^{-1}$  und kohlenstofffreie Kultivierung für 6h) war mittels einer *Microarray*-Analyse jedoch nicht möglich (Mitschke *et al.*, 2011b). Diese Erkenntnisse erlauben die Annahme, dass ein tatsächliches Vorkommen der pRNA-Synthese in *Synechocystis* sehr wahrscheinlich ist, der Zeitpunkt und die Bedingungen des Auftretens jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnten. Aber auch ein Fehlen der pRNA-Synthese würde die Rolle der 6S RNA als Riboregulator in *Synechocystis* nicht ausschließen. Denn die pRNA-Synthese beschleunigt zwar die Dissoziation von 6S RNA und RNAP, ist für diesen Vorgang jedoch nicht zwingend notwendig (Cavanagh *et al.*, 2012), sodass auch andere Regulationsmechanismen denkbar sind (Wassarman, 2018). Abschließend ist aufgrund der Tatsache, dass *in vivo*-generierte pRNA-Transkripte in *Synechocystis* während der Regeneration nach Stickstoffmangel nicht nachgewiesen werden konnten, anzunehmen, dass in *Synechocystis* vermutlich in Bezug auf die pRNA-Synthese ein anderer 6S RNA-Regulationsmechanismus zugrunde liegt, als dies für *E. coli* 6S RNA und *B. subtilis* 6S-1 RNA beschrieben ist.

#### 3.4.6. 6S RNA ist für die Anpassung an Langzeitstickstoffmangel nicht essentiell

Nicht-diazotrophe Cyanobakterien sind in der Lage, nicht nur wenige Tage dauernde Stickstoffmangelbedingungen zu überstehen, sondern wie für *Synechococcus* PCC 7942 berichtet wurde, können auch Zeiträume von mindestens sechs Monaten überdauert werden. Die Anpassung verläuft dabei über einen dreistufigen Adaptationsprozess (Görl *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse zeigt, dass auch *Synechocystis*-Zellen lange Hungerperioden von mindestens sieben Wochen überdauern und anschließend regenerieren können (Abbildung 2.22). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Langzeitstickstoffmangel-Analysen von Klotz *et al.* (2016) überein. Vermutlich können *Synechocystis*-Zellen, ähnlich wie *Synechococcus* PCC 7942, auch deutlich längere Phasen unter Stickstoffmangel überstehen. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass sich 6S RNA-defiziente Zellen nach 36-tägigem Wachstum unter Stickstoffmangel physiologisch nicht von Wildtyp-Zellen unterscheiden haben. Diese Erkenntnis stützt zum einen die in Abschnitt 3.4.2.1 erörterten Daten der *Microarray*-Analyse, die zeigen, dass die Genexpression der beiden Stämme nach

siebtägigem Wachstum unter Stickstoffmangelbedingungen (Zeitpunkt 0h+N) kaum voneinander abwich. Zum anderen bekräftigt dies erneut die Schlussfolgerung, dass die 6S RNA für die Anpassung an langanhaltende Nährstoffmangelbedingungen nicht essentiell ist und scheinbar keine bedeutende regulative Funktion übernimmt. Darüber hinaus sei angemerkt, dass auch *ΔssaA*-Zellen befähigt waren, nach Langzeitstickstoffmangel zu regenerieren. Ob die Regeneration in beiden Stämmen einheitlich verlief, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht ableiten. Weitere Untersuchungen mit einer detaillierten Analyse des Regenerationsprozesses sollten darüber Aufschluss geben, ob die Dauer der stationären Wachstumsphase, in diesem Fall Stickstoffmangel, Einfluss auf die Verzögerung der Regeneration von *ΔssaA* hat. Kompetitive Wachstumsanalysen von Wildtyp- und *ΔssaA*-Zellen bei Langzeitstickstoffmangel sowie mehrmalige Wiederholungen der Stickstoffmangel- und Regenerationsphasen könnten zudem zeigen, ob die Anwesenheit von 6S RNA langfristig einen Wachstumsvorteil für die Zellen bietet.

### 3.5. Schlussbetrachtung

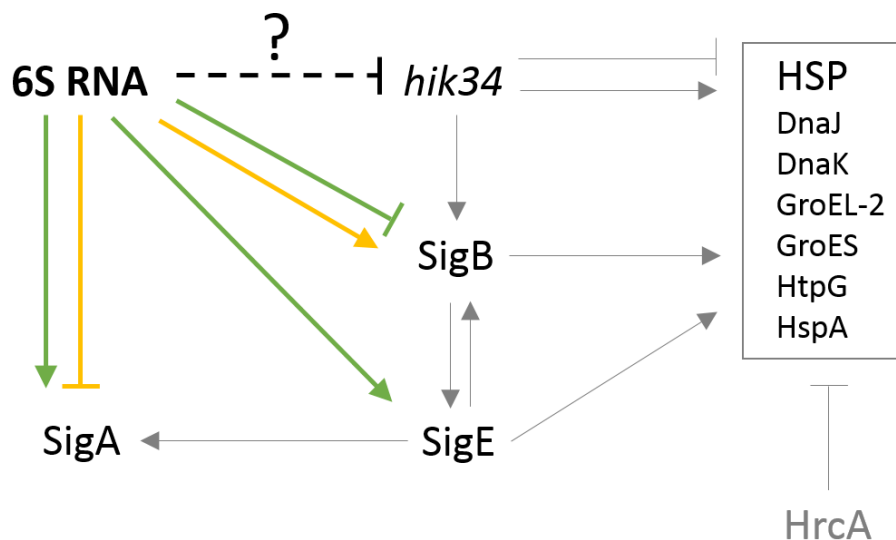
Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, welche funktionelle Rolle 6S RNA innerhalb des Transkriptionsregulationsnetzwerks in Cyanobakterien, hier am Beispiel von *Synechocystis*, einnimmt und welche physiologische Funktion sie für die Zellen hat. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass es große Übereinstimmungen in Bezug auf die Sekundärstruktur und den Regulationsmechanismus mit dem *E. coli* 6S RNA-Homolog gibt (Rediger *et al.*, 2012). Dem gegenüber stand die Veröffentlichung von Watanabe *et al.* (1997), die ein 6S RNA-Akkumulationsmuster für *Synechococcus* sp. PCC 6301 aufzeigt, welches vom *E. coli*-6S RNA-Akkumulationsmuster stark abweicht.

Insgesamt lassen die hier durchgeführten Analysen folgende Schlussfolgerungen zur Funktionsweise von 6S RNA in *Synechocystis* zu: 6S RNA fungiert als positiver Regulator bei der Anpassung an oxidativen Stress und trägt zur Viabilität der Zellen bei. Bei moderatem Hitzestress konnte hingegen kein 6S RNA-vermittelter Wachstumsvorteil gemessen werden. Die Untersuchungen zum Einfluss von 6S RNA auf die Akklimatisierung bei Stickstoffstress ergeben folgendes Bild: 6S RNA ist für eine schnelle Anpassung der Zellen an Stickstoffmangelbedingungen sowie für das Überdauern langer Hungerperioden nicht essentiell und bietet den Zellen keinen Wachstumsvorteil. Dies zeigt sich dadurch, dass sich die Abwesenheit von 6S RNA weder auf die Physiologie noch auf die Genexpression chlorotischer Zellen auswirkt. Interessanterweise spielt 6S RNA jedoch eine entscheidende Rolle für eine schnelle Regeneration nach Stickstoffstress. Diese Auswirkungen sind auf physiologischer und metabolischer Ebene sowie anhand der Genexpression nachzuvollziehen. Die Übereinstimmung der physiologischen, biochemischen und genomischen Daten verdeutlicht dabei die Verlässlichkeit der Ergebnisse. Da mehrere *Gencluster* von einer verzögerten Transkriptionsinitiation in *ΔssaA* betroffen sind, ist davon auszugehen, dass sich der regulatorische Einfluss von 6S RNA auf die globale Genexpression auswirkt. Die 6S RNA-vermittelte Transkriptionsregulation ist außerdem anhand der Daten zum Proteingehalt und Rekrutierung der Sigmafaktoren durch die RNAP zu erkennen. Unter Stickstoffmangelbedingungen geht die Menge von SigA-RNAP-Komplexen stark zurück, während die Bildung von SigC-RNAP- und SigE-RNAP-Komplexen zunimmt und die Menge von SigB-RNAP-

Komplexen konstant bleibt. SigC scheint hierbei entscheidend für die Aufrechterhaltung der Chlorose zu sein. Nach Zugabe von Stickstoff wirkt 6S RNA aktivierend auf die Rekrutierung von SigA, während die Rekrutierung von SigB und SigC limitiert wird. Damit wird ein schneller Wechsel von stressinduzierter Genexpression (in Abhängigkeit der Gruppe 2 Sigmafaktoren) hin zu SigA-abhängiger Genexpression gefördert. Zellen mit 6S RNA haben daher einen klaren Wachstumsvorteil, da sie aus der Chlorose schneller in das exponentielle Wachstum übergehen können. Dabei sei hervorzuheben, dass 6S RNA nicht als der alleinige Faktor für die SigA-Rekrutierung gilt. Die Daten deuten außerdem darauf hin, dass SigG in Abhängigkeit von 6S RNA ebenfalls an dem Transkriptionswechsel nach Stickstoffzugabe beteiligt ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Synthese der sRNA SyR11 in Gegenwart von 6S RNA positiv beeinflusst wird und dass SyR11 möglicherweise eine regulative Rolle in der Stressantwort unter Stickstoffmangel einnimmt. Weiterhin fällt auf, dass die 6S RNA-abhängige Regulation keine signifikanten Auswirkungen auf die Genexpression von Stickstoffregulatoren einschließlich NtcA und SigE hat. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem hier beobachteten Effekt der beschleunigten Stressantwort um einen allgemeinen 6S RNA-abhängigen Effekt handelt, der möglicherweise auch für andere Stressbedingungen gilt.

Zusätzlich lassen die Ergebnisse der Untersuchungen zu oxidativem Stress, Hitze und Stickstoffmangel eine weitere Hypothese zu: 6S RNA ist vermutlich an der Transkriptionsregulation des Gens *hik34* beteiligt. Die Signaltransduktions-Histidinkinase Hik34 ist Teil eines Zwei-Komponenten-Histidinkinase-Systems in Cyanobakterien (Los *et al.*, 2010), welches an der zellulären Stressantwort bei abiotischem Stress beteiligt ist (Cerveny *et al.*, 2015). Hik34 fungiert dabei als Regulator mehrerer HSP, wie GroES, GroEL, Dnak, HspA und DnaJ, deren Expression in Abhängigkeit der jeweiligen Stressbedingung initiiert bzw. reprimiert wird. Bei osmotischem (Marin *et al.*, 2003; Paithoonrangsarid *et al.*, 2004) und oxidativem Stress (Kanesaki *et al.*, 2007) dient Hik34 als positiver und unter Standardwachstumsbedingungen als negativer Regulator der HSP (Suzuki *et al.*, 2005). Hingegen wurde unter Hitzestressbedingungen eine bidirektionale Regulation der HSP durch Hik34 ermittelt (Cerveny *et al.*, 2015). Neben Hik34 sind außerdem SigB, SigD und SigE an der positiven und HrcA an der negativen Transkriptionsregulation der HSP beteiligt. Die Expression von SigB wird indessen durch Hik34 induziert (Singh *et al.*, 2006). Es wurde zudem gezeigt, dass die Expression von *hik34* vom Redoxzustand der photosynthetischen Elektronentransportkette abhängig ist (Hihara *et al.*, 2003). Das Signaltransduktionssystem ist hoch komplex und bisher noch nicht vollständig untersucht. Vermutlich sind weitere Faktoren an der Expression der HSP beteiligt (Cerveny *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen weisen darauf hin, dass 6S RNA hierbei als Regulator fungieren könnte, der die Expression von *hik34* unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration reprimiert (Abschnitt 3.4.2.1, Abbildung 3.1). Dies scheint zudem eine möglicherweise indirekte Expressionsinhibierung der HSP zur Folge zu haben (Tabelle 2.1). 6S RNA könnte somit durch Regulierung der Aktivität der Sigmafaktoren an der Feinjustierung der Genexpression von *hik34* und den HSP beteiligt sein. Eine beschleunigte Transkriptionsinhibierung der HSP fördert die zügige Regeneration nach Stickstoffmangel. Das in Abbildung 3.2 dargestellte hypothetische Schema zeigt die Transkriptionsregulation von *hik34* unter Einbeziehung der in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu

6S RNA, SigA, SigB und SigE. Das Schema wurde dem Modell zur Stressantwort bei Hitzestress in *Synechocystis* aus Singh *et al.* (2006) entlehnt. Ferner sei angemerkt, dass *hik34* (*slr1285*) nur 3568 nt *upstream* von *ssaA* lokalisiert ist, was zusätzlich auf eine regulative Verbindung der beiden Faktoren hindeuten könnte.



**Abbildung 3.2** Hypothetisches Schema zur 6S RNA-vermittelten Transkriptionsregulation von *hik34* und HSP unter Einbeziehung der Sigmafaktoren SigA, SigB und SigE. Dargestellt ist der Einfluss von 6S RNA auf die Rekrutierung der Sigmafaktoren SigA, SigB und SigE durch RNAP unter Stickstoffmangel (gelb) und während der frühen Regenerationsphase (grün) (basierend auf den ermittelten Daten der *in vivo-pulldown*-Analyse, Abschnitte 2.2.7.3.2 und 3.4.3). Die gestrichelte Linie indiziert eine mögliche (in)direkte Inhibierung von *hik34* durch 6S RNA (basierend auf den ermittelten Daten der *Microarray*-Analyse, Abschnitte 2.2.7.2.1, 2.2.7.2.2 und 3.4.2). Die durch graue Pfeile angedeuteten Interaktionen, u. a. von HrcA, sind dem Modell von Singh *et al.* (2006) entnommen und basieren auf *Microarray*-Daten zu  $\Delta sigB$ ,  $\Delta sigE$  und  $\Delta hik34$ , die unter Hitzestress bzw. während des Wechsels von exponentiellem zu stationärem Wachstum ermittelt wurden (Suzuki *et al.*, 2005).

Des Weiteren lassen die Ergebnisse zur 6S RNA-Transkriptakkumulation und zur pRNA-Synthese vermuten, dass der 6S RNA-abhängige Regulationsmechanismus in *Synechocystis* anders verläuft, als dies für *E. coli*-6S RNA und *B. subtilis*-6S-1 RNA bekannt ist. Demzufolge scheint es möglich zu sein, dass die SigA-RNAP-Komplexbildung und -zerfall unabhängig des 6S RNA-Levels und der pRNA-Synthese stattfinden. Gegebenenfalls existiert hier ein bisher unbekannter Mechanismus für die 6S RNA-abhängige Transkriptionsregulation. Gleichwohl kann auch die 6S RNA aus *Synechocystis* als Riboregulator der Transkription verstanden werden, welcher entscheidend an einem schnellen *Outgrowth* aus stationären Wachstumsbedingungen beiträgt. Insofern schließt sich hier im Hinblick auf die physiologische Rolle der cyanobakteriellen 6S RNA der Kreis zu anderen 6S RNA-Homologen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

Dieses Unterkapitel beschreibt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte. Nicht aufgeführt sind die üblichen Labormaterialien, wie z. B. Glas- und Reaktionsgefäße, Kultivierungsgefäße, Petrischalen, Sterilfilter, Pipetten oder flüssiger Stickstoff. Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro Analysis* verwendet.

#### 4.1.1. Mikroorganismen

##### 4.1.1.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Nachstehende *E. coli* Stämme wurden verwendet:

**Tabelle 4.1. Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Hersteller/Referenz	Verwendung
NEB 5-alpha (DH5α-Derivat)	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Ø80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main	Klonierung
J53 (RP4)	R+, <i>met</i> , <i>pro</i> (RP4: <i>Amp</i> , <i>Tc</i> , <i>Km</i> , <i>Tra</i> <sup>+</sup> , <i>IncP</i> )	Wolk <i>et al.</i> (1984)	Konjugation von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803

##### 4.1.1.2. Cyanobakterienstämme und -mutanten

Folgende Cyanobakterienstämme und -mutanten wurden verwendet:

##### *Synechocystis* sp. PCC 6803

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Wildtyp-Stamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 gearbeitet, welcher von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Sergey V. Shestakov (Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm hat eine Genomgröße von 3,57 Mbp und besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme exogener DNA. Alle in dieser Arbeit generierten Mutanten basieren auf dem glukosetoleranten, motilen Wildtyp-Stamm „PCC-M“, der vor wenigen Jahren resequenziert wurde (Trautmann *et al.*, 2012).

Die folgenden beiden *Synechocystis* Mutanten wurden von Anne Rediger hergestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die vollständige Segregation mittels PCR-Analyse (Abschnitt 4.2.2.1) überprüft.

***ΔssaA***

Deletion des *ssaA* Gens (6S RNA) von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette in den deletierten Locus zwischen den Positionen 1886879 und 1887066 (Heilmann *et al.*, 2017; Rediger *et al.*, 2012).

**6S(+)**

Wildtyp mit autonom replizierendem pVZ321, der zur konstitutiven Überexpression der 6S RNA die Sequenz des *ssaA* Gens und die *ssaA*-Promoter-Sequenz sowie eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette enthält (pVZ321\_(150+)6S; Tabelle 4.2; (Heilmann *et al.*, 2017)).

Folgende Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert:

***ΔssaA-c***

Komplementierung der *ΔssaA*-Mutante. Dafür wurde in die *ΔssaA*-Mutante ein autonom replizierender pVZ321, der zur Expression der 6S RNA die Sequenz des *ssaA* Gens und die *ssaA*-Promotor-Sequenz enthält, konjugiert (Abschnitt 4.2.2.9). Die Mutante enthält neben einer Kanamycin- auch eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette (pVZ321\_(150+)6S; Tabelle 4.2; Heilmann *et al.* (2017)).

**WT-RNAP-HIS**

Die native  $\gamma$ -Untereinheit (*rpoC1*) der RNAP wurde durch eine  $\gamma$ -Untereinheit mit C-terminalem His-tag und Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette (*downstream*) ersetzt. Für die Generierung der Mutante wurde der von Koskinen *et al.* (Koskinen *et al.*, 2016) beschriebene Expressionsvektor (pMA-T-His-tag-Cm; Tabelle 4.2) in *Synechocystis* Wildtyp-Zellen transferiert (Abschnitt 4.2.2.8; Heilmann *et al.* (2017)).

***ΔssaA*-RNAP-HIS**

Die native  $\gamma$ -Untereinheit (*rpoC1*) der RNAP in der *ΔssaA*-Mutante wurde durch eine  $\gamma$ -Untereinheit mit C-terminalem His-tag und Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette (*downstream*) ersetzt. Für die Generierung der Mutante wurde der von Koskinen *et al.* (Koskinen *et al.*, 2016) beschriebene Expressionsvektor (pMA-T-His-tag-Cm; Tabelle 4.2) in *ΔssaA*-Zellen transferiert (Abschnitt 4.2.2.8; Heilmann *et al.* (2017)).

#### 4.1.2. Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

**Tabelle 4.2. Verwendete Plasmide**

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pVZ321	<i>Shuttle</i> -Vektor zur homologen Expression in <i>Synechocystis</i> ; mobilisierbar; Cm <sup>r</sup> und Km <sup>r</sup> ; Größe: 9601 bp	Zinchenko <i>et al.</i> (1999)

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Hersteller/Referenz
RP4	Helferplasmid zur Konjugation von Cyanobakterien; Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> ; Größe: 56400 bp	Haase <i>et al.</i> (1995)
pJET1.2	Klonierungsvektor	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
pVZ321_(150+) <sub>6S</sub>	<i>Shuttle</i> -Vektor zur Expression von 6S RNA unter dem 6S RNA-eigenen Promoter; Cm <sup>r</sup>	Dr. Anne Rediger; Heilmann <i>et al.</i> (2017)
pMA-T-HIS-tag-Cm	Expressionsvektor, enthält die synthetisch erstellte Nukleotidsequenz von <i>rpoC1</i> ( $\gamma$ -Untereinheit der RNAP) mit C-terminalen His-tag sowie <i>downstream</i> Cm <sup>r</sup>	Koskinen <i>et al.</i> (2016)

#### 4.1.3. Medien, Stammlösungen und Puffer

Medien, Lösungen und Puffer wurden ausschließlich mit *Aqua dest.* (dH<sub>2</sub>O) angesetzt. Lösungen und Puffer, die für die Arbeit mit RNA eingesetzt wurden, wurden zur Dekontamination von Ribonukleasen durch Millex-Gs Sterilfilter (MilliQ) filtriert. Die Zusammensetzung von Medien, Stammlösungen und Puffern sowie der Vermerk, ob diese sterilfiltriert oder autoklaviert wurden, sind im Methodenteil in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

#### 4.1.4. Chemikalien

Die nachfolgende Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien und Lösungsmittel auf.

**Tabelle 4.3. Chemikalien**

Produkt	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
2-Propanol (100%ig)	Roth, Karlsruhe
2,6-Dimethoxybenzoquinon (DMBQ)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammonium Eisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid (BisAA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
CDP-Star	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Chloramphenicol	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Coomassie brilliant blue R-250	Roth, Karlsruhe



Produkt	Hersteller
Deoxycholat (DOC)	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Roth, Karlsruhe
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsuloxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Eisenammoniumcitrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100%ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37%ig)	Roth, Karlsruhe
Formamid (deionisiert, $\geq 99,5\%$ ig)	Roth, Karlsruhe
GelRed	Biotium, Fremont, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hoest 33342 Solution	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
India Ink Reagent Droppers	Becton, Dickinson and Company
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumferricyanid	Fluka, Honeywell, Seelze
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Sulfat-Salz)	Roth, Karlsruhe
Kobalt(II)-nitrat (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Roth, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LE-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol (99%ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Midori Green Advance	Nippon Genetics, Düren
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N,N-Tetramethylethylengiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Na-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Na-Thiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin (Tricin)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot A Anodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot K Kathodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese 10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (19:1) Acrylamid / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (29:1) Acrylamid / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SYBR Gold	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tri-Natrium-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trizol-Reagenz	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

#### 4.1.5. Radiochemikalien

Nachstehende Radionukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Radionukleotide wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen:

- [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP, spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mmol
- [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP, spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mmol

#### 4.1.6. Molekulargewichtsmarker

Folgende Größenstandards wurden für die Gelelektrophorese verwendet:

**Tabelle 4.4. Größenstandards**

DNA-Standards	Hersteller
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RNA-Standards	Hersteller
RiboRuler Low Range RNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Protein Standards	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

#### 4.1.7. Enzyme

Tabelle 4.5 listet die genutzten Enzyme und Reaktions-Kits auf.

**Tabelle 4.5. Verwendete Enzyme und Reaktions-Kits**

Enzym/Reaktions-Kits	Hersteller
<i>AmpliScribeT7-Flash Transcription Kit</i>	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
Amyloglucosidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>DIG Northern Starter Kit</i>	Roche, Berlin
<i>DNase I (RNase-free)</i>	New England, Biolabs, Schwalbach
<i>RQ1 RNase-Free DNase</i>	Promega, Mannheim
<i>DreamTaq DNA-Polymerase</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Infinity Glucose hexokinase Liquid Stable Reagent</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>MEGashortscript™ T7 Transcription Kit</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	New England, Biolabs, Schwalbach
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RNase A solution	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
T4-Polynukleotid-Kinase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

#### 4.1.8. Synthetische Oligonukleotide

Die in Tabelle 4.6 aufgeführten Oligonukleotide und Primer wurden von den Firmen Thermo Scientific (St. Leon-Rot), SMB Services in Molecular Biology GmbH (Rüdersdorf), IDT Biologika GmbH (Dessau-Rosslau) und Sigma-Aldrich (Steinheim) in lyophilisierter Form bezogen. Für die Herstellung von Stammlösungen wurden die Oligonukleotide in MQ-dH<sub>2</sub>O zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst. Bei Oligonukleotiden, die für eine T7-*in vitro*-Transkription (Abschnitt 4.2.3.5) verwendet wurden, sind die Basen des T7-Promoters unterstrichen.

**Tabelle 4.6. Synthetische Oligonukleotide und Primer** (siehe folgende Seite)

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
AssaA_700up-Fw (P1)	CACCGCCTACCTGAATATCTG	Kolonie-PCR
AssaA_700down-Rv (P2)	CAAGGAATTAGACCGCATCGG	Kolonie-PCR
slr1288_Fw (P3)	GGAGCCCCCTAAGCCGTACC	Klonierung AssaA
3'slr1288_Rv (P4)	CCTGCCATTATAACCCCATCTTCG	Klonierung AssaA
Km_Fw (P5)	GGTTATAATGGCAGGGGGGGGGGAAAGC	Klonierung AssaA
Km_Rv (P6)	ACCTGAGAAGCAGAGCCGTCCTCAAGTCAGCGTAAT	Klonierung AssaA
sl1166_Fw (P7)	CTCTGCTTCTCAGGTTTATCCCTCC	Klonierung AssaA
3'sl1166_Rv (P8)	GGTAGATACCTGGTCATTCTGGTTTG	Klonierung AssaA
pVZ_Xho_Fw	TTATACGCAAGGCGACAAGG	Kolonie-PCR
pVZ_Xba_Rv	GAGAAGCACCAACACGCCG	Kolonie-PCR
Chis3end_Fw	GAGGTCATCAAAAACCGAGGA	Kolonie-PCR
Chis3end_Rv	CAAGGGAGCAGGATCAAAA	Kolonie-PCR
C_HIStag_R	TGATGGTGATGATGATGGTG	Kolonie-PCR
T7_5S_Rv	TAAATACGACTCACTATAGGGACTTGGCATCGGACTATTGTGC	in vitro-Transkription/RNA-Sonde*
5S_Fw	TC'TTGGTGTC'TTTAGCGTCATGGAAC	in vitro-Transkription/RNA-Sonde
T7_pRNA_Fw	TAAATACGACTCACTATAGGGATAGATCAAAAAACGTTGTTGGCAGTCACC	in vitro-Transkription *
pRNA_Rv	GGTGACTGCCAACACACGTTT'TTGATCTAT	in vitro-Transkription
SyR11_Fw	AACGAAATAACACGGGGTCAC	in vitro-Transkription/RNA-Sonde
T7_SyR11_Rv	TAAATACGACTCACTATAGGGACAAATTTTAAAGGGATCAAG	in vitro-Transkription/RNA-Sonde *
*Unterstrichen: T7-Promoter		
5S rRNA_Rv	GCATCGGACTATTGTGCCGTG	Oligonukleotid-Sonde
6S rRNA_Rv	CACCACGCCGTTTACCT	Oligonukleotid-Sonde
pRNA-RNA/LNA	DIG-GGTGA <u>CUGCC</u> CA <u>CA</u> ACG <u>UUUUUU</u> GU <u>CUA</u> T-DIG	RNA/LNA-Sonde mit Digoxigenin-Modifizierung
Doppelt unterstrichen: LNA-Nukleotide		
DIG: Digoxigenin-Modifizierung		

#### 4.1.9. Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Immunoblot-Analysen verwendet:

**Tabelle 4.7. Antikörper**

Antikörper	Beschreibung / Verdünnung in 1x TSB	Hersteller / Referenz
RGS-HIS-tag	Maus IgG, primärer Antikörper gegen His-getagte Proteine mit einem RGS-His Epitop / 1:2.000	Qiagen, Hilden
anti-alpha	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CKSYTDQPQIGRLTA, abgeleitet von der $\alpha$ -Untereinheit der RNA Polymerase aus <i>Synechocystis</i> / 1:8.000	Agrisera, Vännäs, Schweden Gunnellius <i>et al.</i> (2014)
anti-beta	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CIRVQPHSPDNPAEK, abgeleitet von der $\beta$ -Untereinheit der RNA Polymerase aus <i>Synechocystis</i> / 1:8.000	Agrisera, Vännäs, Schweden Gunnellius <i>et al.</i> (2014)
anti-gamma	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid DQWVEIEDQIYAEDS, abgeleitet von der $\gamma$ -Untereinheit der RNAP Polymerase aus <i>Synechocystis</i> / 1:6.000	Agrisera, Vännäs, Schweden Koskinen <i>et al.</i> (2016)
anti-SigA	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid CVAATEGKEKKVRKI, abgeleitet von dem $\sigma$ -Faktor SigA aus <i>Synechocystis</i> / 1:1.000	Agrisera, Vännäs, Schweden Gunnellius <i>et al.</i> (2014)
anti-SigB/SigD	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid RTIRLPIHTEKLNKIKK, abgeleitet von den $\sigma$ -Faktoren aus <i>Synechocystis</i> SigB und SigD / 1:1.000	Agrisera, Vännäs, Schweden Koskinen <i>et al.</i> (2016)
anti-SigC	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid RRDRIRDYYENLG, abgeleitet von dem $\sigma$ -Faktor SigC aus <i>Synechocystis</i> / 1:10.000	Innovagen, Lund, Schweden Gunnellius <i>et al.</i> (2010)
anti-SigE	Kaninchen IgG, primärer Antikörper gerichtet gegen das Peptid LRRPQVARRLKGWL, abgeleitet von dem $\sigma$ -Faktor SigE aus <i>Synechocystis</i> / 1:1.000	Innovagen, Lund, Schweden Koskinen <i>et al.</i> (2016)
anti-IgG-Kaninchen; AP-Konjugat	Ziege IgG, sekundärer Antikörper gerichtet gegen invariable Kette von Kaninchen IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP) / 1:50.000	Zymed, Thermo Scientific, St. Leon-Rot
anti-IgG-Maus; HRP-Konjugat	Ziege IgG, sekundärer Antikörper gerichtet gegen invariable Kette von Maus IgG, konjugiert mit HRPeroxidase (HRP) / 1:5.000	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 4.1.10. Kits und sonstige Materialien

Tabelle 4.8 listet die zur Anwendung gekommenen Filter, Membranen, *Kits* und sonstige Materialien auf.

**Tabelle 4.8. Verwendete Kits und sonstige Materialien**

Produkt	Hersteller
3 MM-Filterpapier	Whatman Paper Ltd., Maidstone, GB
20-400   Magna GriP™ Rack (8 well)	Merck, Millipore, Darmstadt
C-Chip, Neubauer improved, Zählkammer	Biochrom, Berlin
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glasperlen 0,1/0,25-0,5 mm	Roth, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
HATF-Filter	Merck Millipore, Darmstadt
Hybond N <sup>+</sup> -Membranen	GE Healthcare, Waukesha, USA
<i>Illustra™ MicroSpin G-50 columns</i>	GE Healthcare, Waukesha, USA
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche, Berlin
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Berlin
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
Dynabeads® His-Tag Isolation and Pulldown	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Millex-G5 Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Merck, Millipore, Darmstadt
NEXT®GEL 10x Solution	Amreasco, USA
Protein-Ladepuffer (NEXT GEL, SAMPLE LOADING BUFFER, 4 x)	Amreasco, USA
RNA Gel Loading Dye (2X)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Röntgenfilme	GE Healthcare, München
Roti®-PVDF (0,45 µm Porengröße)	Roth, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1,0 mm	Roth, Karlsruhe
Steril-Filter (0,25 µm Porengröße)	Renner, Dannstadt
Vivaspin 500, 5000 MWCO	GE Healthcare, München

#### 4.1.11. Laborgeräte

In Tabelle 4.9 sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Laborgeräte aufgelistet.

**Tabelle 4.9. Geräteliste**

Geräte/(-typ)	Hersteller
Aquarien-Durchlüfter Pumpe	Shego Optimal, Shego, Offenbach Elite 800, Hagen Deutschland, Holm
Autoklav	CertoClav MultiControl 12/18L, CertoClav Sterilizer GmbH, Traun, Österreich Varioklav Dampfsterilisator Typ 400, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Blaulichttisch	BLstar 16, Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank	B 6200, Heraeus, Hanau
Eisbereiter	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Elektrode	Clark type oxygen electrode, Hansatech instruments, Norfolk, UK
Flachbettschüttler	Shaker DOS-10L, Neolab, Heidelberg Edmund Bühler Swip KI-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen Sunlab, Neolab, Heidelberg
Gasbrenner	Fuego SCS basic RF, WLD-TEC GmbH, Göttingen Gasprofi 1 SCS micro, WLD-TEC GmbH, Göttingen
Geldokumentation	Gel iX system, Intas, Göttingen Molecular Imager ChemiDoc MP, Bio-Rad, München Molecular Imager ChemiDoc XRS+, Bio-Rad, München

<b>Geräte/(-typ)</b>	<b>Hersteller</b>
Geltrockner	Bio-Rad Gel Dryer 583, Bio-Rad, München
Horizontale Gelelektrophoresekammern (für Agarosegele)	Bio-Rad-Mini Sub DNA-Cell, München PerfectBlue Gelsystem Mini S und M, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Elektrophoresekammer Maxi, Neolab, Heidelberg
Hybridisierungsöfen	OV 1000, Analytik Jena, Jena PerfectBlot, Peqlab Biotechnologie GmbH, Tuttlingen OV 3, Biometra GmbH, Göttingen
Klimaschrank	Sanyo Versatile environmental Test Chamber MLR 351 und MLR 352, Panasonic, Bad Nenndorf New Brunswick Innova 42/42R, Eppendorf AG, Hamburg
Laborwaagen	PLJ, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern BP 310 S und VWR1502, Sartorius AG, Göttingen Denver Instruments SI – 234 A, Sartorius AG, Göttingen
Folienschweißgerät	C-230, Hacona, Budapest, Ungarn
Leuchtplatte	REX
Lichtstärkemessgerät	LI-193 Spherical Quantum Sensor, Li-Cor, Bad Homburg
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach HI 200M, Hanna Instruments, Vöhringen
Mikroskop	Primo Star, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Zeiss AxioLab, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikrotiterplattenleser	Multiskan Ascent, Labsystems, Bradenton, USA BMG FLUOstar optima, BMG Labtech GmbH, Ortenberg
PCR-Thermocycler	FlexCycler <sup>2</sup> , Analytik Jena, Jena Peqlab primus 25 advanced, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	WTW pH 538, Weilheim
Phosphorimager	Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad, München FLA-3000, Fujifilm, Tokio, Japan
Rotationsschüttler	Intelli Mixer RM-2M, ELML Ltd., Riga, Litaun
<i>Semi-Dry</i> -Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad München
Spannungsquellen	PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad, München PowerPac HC, Bio-Rad, München PowerPac Universal, Bio-Rad, München
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie, Erlangen NanoDrop ND-2000c UV/Vis-Spektralphotometer, Peqlab Biotechnologie, Erlangen Specord 200 plus, Analytik Jena, Jena S2000, Ocean Optics Inc., Dunedin, USA UV/VIS Spektralphotometer Lambda Bio, Perkin Elmer

Geräte/(-typ)	Hersteller
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig Heraeus Lamin Air, Hanau BioWizard Silver SL 130, Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Thermoblock /-mixer	ThermoMixer C, Eppendorf AG, Hamburg ThermoMixer 5437, Eppendorf AG, Hamburg Thermo-shaker, PHMT, Grant Instruments, Cambridge, UK
Tischzentrifugen	5424, Eppendorf AG, Hamburg 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifugen (kühlbar)	5424 R, Eppendorf AG, Hamburg Mirko 200R, Hettich, Tuttlingen
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Berlin
UV-Quervernetzer	UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA
UV-Transilluminator	TFX-35M UV Transilluminator, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Vertikale Gelelektrophoresekammern (für PAA-Gele)	Protean II xiCell, Bio-Rad, München Mini-Protean II, Bio-Rad, München Hoefer SE 260 Mighty Small, Amersham Bioscience, Freiburg Peqlab Twin ExW S, Peqlab Biotechnologie GmbH, Tuttlingen
Vortexer	Reax 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach Vortex Genie 2, Neolab, Heidelberg
Wasserbäder	GFL-1086, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel Julabo SW 20, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellmühle	Retsch, Haan Precellys 24, Bertin Technologies, Frankreich
Zentrifugen	Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig Rotoren: TX-750 und F14-6x250LE, beide von Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig

#### 4.1.12. Software und Datenbanken

Die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Datenbanken und Software sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

**Tabelle 4.10. Software und Datenbanken**

Name	Adresse/Referenz
Artemis	<a href="http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis">http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis</a> (Rutherford <i>et al.</i> , 2000)
CyanoBase	<a href="http://genome.microbedb.jp/cyanobase/">http://genome.microbedb.jp/cyanobase/</a> (Nakamura <i>et al.</i> , 1998)
Image Lab	Bio-Rad, München
MEME	<a href="http://meme-suite.org/tools/meme">http://meme-suite.org/tools/meme</a> (Bailey & Elkan, 1994)



Name	Adresse/Referenz
Multiple Experiment Viewer	TM4 Software Suite (Saeed <i>et al.</i> , 2003)
Oligo Cal	<a href="http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html">http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html</a>
Primer3	<a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a> (Rozen & Skaletsky, 1999)
Quantity One	Bio-Rad, München

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Allgemeine mikrobiologische und physiologische Methoden

Mikrobiologische Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen (GvO; Risikogruppe S1) erfolgten nach den Vorschriften des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (GenTG).

#### 4.2.1.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten mit Bakterienstämmen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Arbeiten mit *E. coli* Stämmen wurden am Bunsenbrenner, Arbeiten mit *Synechocystis*-Stämmen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Medien, Puffer, Lösungen und Glasgeräte wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min., 120 °C, 2-3 bar; im Folgenden bezeichnet als Autoklavieren) bzw. Filtration durch Membranen mit 0,22 µm Porengröße sterilisiert.

#### 4.2.1.2 Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803

##### Anzucht in Flüssigkulturen:

Die Kultivierung von *Synechocystis* in Flüssigkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 30 °C photoautotroph (oder wenn vermerkt: mixoautotroph) in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) in Erlenmeyerkolben auf einem Flachbettschüttler (~ 150 rpm) oder in Glasfermentoren unter kontinuierlicher Begasung mit steriler Raumluft. Dabei wurden die Kulturen durchgehend mit Weißlicht (Mitsubishi, Osram FL4OSS-W/37) mit einer Intensität von 40 - 80 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Normallicht) belichtet.

##### Anzucht auf Festmedium:

Zur Stammhaltung von *Synechocystis* wurden die einzelnen Stämme (Abschnitt 4.1.1.2) auf BG11-Festmedium (BG11-Medium, 0,75 % (w/v) Agar) ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte unter Dauerbelichtung mit Weißlicht (Mitsubishi, Osram FL4OSS-W/37) mit einer Intensität von 40 - 80 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bei 30 °C. Zur Selektion der *Synechocystis*-Mutanten wurden die jeweiligen Antibiotika (Endkonzentration: Kanamycin (Km) 20 µg ml<sup>-1</sup> bzw. Chloramphenicol (Cm) 15 µg ml<sup>-1</sup>) dem Medium hinzugefügt.

Alle vergleichenden Wachstumsanalysen des *Synechocystis*-Wildtyps und der 6S RNA-Mutanten erfolgten stets ohne Zugabe von Antibiotika, um gleiche Wachstumsbedingungen zu gewähren.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurde eine Stammsammlung aller generierten Stämme angelegt. Dafür wurden die Zellen steril in 1 ml Kryo-Medium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

**1 x BG11-Medium:**

10 ml l<sup>-1</sup> 100 x BG11  
 10 ml l<sup>-1</sup> 1 M TES-Puffer, pH 8,0  
 1 ml l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mg/ml)  
 1 ml l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30 mg/ml)  
 1 ml l<sup>-1</sup> Spurenelementmix  
 ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O autoklavieren  
 1 ml l<sup>-1</sup> Eisenammoniumcitrat (6 mg/ml, sterilfiltriert)

**1 x BG11-Medium -N:**

20 ml l<sup>-1</sup> 50 x BG11 -N  
 10 ml l<sup>-1</sup> 1 M TES-Puffer, pH 8,0  
 1 ml l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mg/ml)  
 1 ml l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30 mg/ml)  
 1 ml l<sup>-1</sup> Spurenelementmix  
 ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O autoklavieren  
 1 ml l<sup>-1</sup> Eisenammoniumcitrat (6 mg/ml, sterilfiltriert)

**Spurenelemente (sterilfiltriert):**

2,86 g l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
 1,81 g l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
 0,222 g l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 0,390 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 0,079 g l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
 0,049 g l<sup>-1</sup> Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

**2 x BG11-Medium, für Agarplatten (autoklaviert):**

20 ml l<sup>-1</sup> 100 x BG11  
 20 ml l<sup>-1</sup> 1 M TES-Puffer, pH 8,0  
 2 ml l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 mg/ml)  
 2 ml l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30 mg/ml)  
 2 ml l<sup>-1</sup> Spurenelementmix  
 ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O autoklavieren  
 2 ml l<sup>-1</sup> Eisenammoniumcitrat (6 mg/ml, sterilfiltriert)

Optional:

0,3 % (v/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (30%), (autoklaviert)  
 10 mM Glukose (sterilfiltriert)

**100 x BG11-Medium (autoklaviert):**

149,58 g l<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>  
 7,49 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
 3,6 g l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 0,6 g l<sup>-1</sup> Zitronensäure  
 0,25 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0

**50 x BG11-Medium -N (autoklaviert):**

3,74 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
 1,8 g l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 0,3 g l<sup>-1</sup> Zitronensäure  
 0,56 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0

**Antibiotika-Stammlösungen (sterilfiltriert):**

50 mg ml<sup>-1</sup> Kanamycin (Km)  
 25 mg ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol (Cm; in 97 % Ethanol)

**Kryo-Medium:**

0,5 x BG11-Medium  
 8 % (v/v) DMSO

#### 4.2.1.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

##### Anzucht in Flüssigkulturen:

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte unter aeroben Standardbedingungen in LB-(*lysogeny broth*) Medium bei 37 °C auf einem Flachbettschüttler (200 rpm) (Sambrook & Russell, 2001).

##### Anzucht auf Festmedium:

Die Anzucht von *E. coli* für Klonierungsarbeiten erfolgte auf LB-Agar-Festmedium über Nacht (ÜN) bei 37 °C im Brutschrank.

Die Medien sowie der LB-Agar wurden vor der Verwendung jeweils autoklaviert. Die Kultivierung und Selektion von plasmidtragenden Bakterienstämmen wurde durch Zugabe der jeweiligen Antibiotika, mit den folgenden Endkonzentrationen: Ampicillin (Amp) 100 µg ml<sup>-1</sup>, Kanamycin (Km) 20 µg ml<sup>-1</sup> und Chloramphenicol (Cm) 25 µg ml<sup>-1</sup>, gewährleistet.

Zur längeren Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden 3 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum versehen, mit den Zellen einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden 700 µl der Bakterienkultur mit 300 µl 50 % Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C aufbewahrt.

#### 4.2.1.4 Bestimmung der Dichte in Flüssigkulturen

Zur Bestimmung der Zelldichte (Optische Dichte (OD)) von Flüssigkulturen wurde die Streuung bei einer Wellenlänge von 750 nm (*Synechocystis*) bzw. 600 nm (*E. coli*) in Einmalküvetten (aus Polystyrol) an einem Spektralphotometer (Specord200 Plus) ermittelt. Als Referenz wurde das jeweilige Medium eingesetzt. Bei der Bestimmung der Zelldichte aus Proben von Wachstumsversuchen mit *Synechocystis* wurde darauf geachtet, dass die Proben in einem linearen Bereich bei einer OD von 0,4 - 0,6 gemessen wurden. Flüssigkulturen mit einer höheren Zelldichte wurden jeweils vor der Messung auf eine entsprechende OD verdünnt.

#### 4.2.1.5 Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis*

Zur physiologischen Untersuchung von *Synechocystis*-Kulturen wurden Absorptionsspektren ganzer *Synechocystis*-Zellen in BG11-Flüssigkulturen bei (Raumtemperatur) RT im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm in Einmalküvetten (aus Polystyrol) an einem Spektralphotometer (Specord200 Plus) aufgenommen. Als Referenz wurde BG11-Medium verwendet. Vor den Messungen wurde eine Basislinie mit BG11-Medium aufgezeichnet. Absorptionsspektren verschiedener Flüssigkulturen wurden auf die OD<sub>750nm</sub> normiert.

Um Veränderungen im Phycocyanin-Gehalt zu verdeutlichen, wurde das Absorptionsmaximum des Chlorophyll *a* bei ca. 680 nm ermittelt und nach der folgenden Formel auf eine OD von 1 normiert:

$$\frac{OD_{400nm} - OD_{750nm}}{OD_{680nm} - OD_{750nm}}$$

#### 4.2.1.6 Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses

Das Verhältnis von Phycocyanin (PC) zu Chlorophyll *a* (Chl) in *Synechocystis*-Flüssigkulturen wurde durch Messung von Absorptionsspektren ganzer Zellen in Einmalküvetten (aus Polystyrol) an einem Spektralphotometer (Specord200 Plus) ermittelt (Abschnitt 4.2.1.5). Anschließend wurde das PC/Chl-Verhältnis mit einer modifizierten Formel nach Myers *et al.* (1980) berechnet.

$$\frac{PC}{Chl} = \frac{1,0162 * OD_{625nm} - 0,2612 * OD_{678nm}}{1,0162 * OD_{678nm} - 0,063 * OD_{625nm}}$$

#### 4.2.1.7 Tropftests (*Spot assay*)

Für die Untersuchungen des Wachstums von *Synechocystis* auf Festmedium wurden 10 x 10 cm große, quadratische Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Dafür wurden *Synechocystis*-Flüssigkulturen zunächst in BG11-Medium für einige Tage unter Standardbedingungen (Abschnitt 4.2.1.2) kultiviert, bis sie eine  $OD_{750nm}$  von ca. 0,7 erreicht haben. Anschließend wurden die Flüssigkulturen mit BG11-Medium auf exakt die  $OD_{750nm}$  von 0,6 ( $10^0$ ) angeglichen. Ausgehend von dieser Verdünnung wurden weitere Verdünnungsreihen mit BG11-Medium in Schritten um den Faktor  $10^{-1}$  hergestellt. Flüssigkulturen mit einer  $OD_{750nm}$  von 0,5 bzw. 0,6 und den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  wurden tropfenweise zu je 7 µl nacheinander auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar) in Petrischalen aufgetragen. Das BG11-Festmedium wurde optional mit 0,3 % (w/v) mit Na-Thiosulfat ( $Na_2S_2SO_3$ ) und / oder 10 mM Glukose ergänzt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte für mindestens sieben Tage unter den in Abschnitt 4.2.1.2 angegebenen Wachstumsbedingungen. Für den in Abschnitt 2.2.5.1 beschriebenen Wachstumstest, wurden die Zellkulturen bei 30 °C unter Dauerbelichtung mit Weißlicht (Mitsubishi, Osram FL4OSS-W/37) verschiedener Lichtstärken (1, 10, 35, 51, 112 und 225 µmol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$ ) angezogen.

#### 4.2.1.8 Stickstoffentzug aus dem Medium (*Step down*)

Zur Wachstumsanalyse in Stickstoffmangelbedingungen wurden *Synechocystis*-Zellen in Glasfermentoren in BG11-Medium bei einer Lichtintensität von 80 µmol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  unter den in Abschnitt 4.2.1.2 beschriebenen Angaben angezogen, bis sie eine  $OD_{750nm}$  von 1 aufwiesen. Die Zellen wurden dann zu je 50 ml bei RT und 3.500 rpm (Rotor: TX-750, Thermo Fisher Scientific) für 10 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend zweimal in 50 ml BG11-Medium -N gewaschen (10 min, 3.500 rpm, RT), in BG11-Medium -N resuspendiert und auf eine  $OD_{750nm}$  von 0,6 eingestellt. Die Zellen wurden dann in Glasfermentoren bei den üblichen Bedingungen (Abschnitt 4.2.1.2) kultiviert.

#### 4.2.1.9 Ergänzung des BG11-Mediums -N mit Stickstoff (Regeneration)

Für die in dem Unterkapitel 2.2.7 beschriebenen Analysen wurde folgender Versuchsaufbau entworfen: Die Zellanzucht erfolgte zunächst wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben. Die unter Stickstoffmangel wachsenden *Synechocystis*-Kulturen (Abschnitt 4.2.1.8) wurden für sieben Tage bei  $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Durch Ergänzung der Zellen mit Stickstoff (Supplementierung mit  $17,6 \text{ mM NaNO}_3$ ), wurde der Stickstoffanteil im Medium auf die Ausgangskonzentration gebracht. Die Zellen wurden für mindestens vier weitere Tage unter den +N Bedingungen kultiviert. Ab dem Zeitpunkt der Stickstoffzugabe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (u. a. 1 h +N, 4 h +N, 22 h +N und 48 h +N) Proben für die physiologischen Untersuchungen (Abschnitt 2.2.7.1), *Microarray*-Analyse (Abschnitt 2.2.7.2) und *in vivo-pulldown*-Analyse (Abschnitt 2.2.7.3) genommen. Die Anzucht der 6S RNA-Mutanten erfolgte ohne Antibiotikum.

### 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.2.1 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *in vitro* Amplifikation definierter Abschnitte eines DNA-Stranges wurde mittels PCR durchgeführt (Mullis *et al.*, 1986). Dabei kamen zwei Polymerasen zum Einsatz: Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für anschließende *in vitro*-Transkriptionen und Klonierungen verwendet werden sollten, wurde die *Q5 High-Fidelity* DNA-Polymerase (New England, Biolabs, Schwalbach) aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) verwendet. Für analytische Untersuchungen, wie z. B. Kolonie-PCRs, wurde die *DreamTaq* DNA-Polymerase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) verwendet. Kolonie-PCRs wurden in  $20 \mu\text{l}$  Ansätzen durchgeführt, die Zellmaterial aus *Synechocystis* enthielten. Das Zellmaterial wurde zuvor für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt, um die genomische DNA zugänglich zu machen. Für präparative Amplifikationen diente isolierte genomische DNA aus *Synechocystis* als Matrize, die in  $50 \mu\text{l}$  Reaktionsvolumen eingesetzt wurde. Die PCR-Bedingungen wurden unter Beachtung der Schmelztemperaturen der verwendeten Primer (Programm: Oligo Cal; Tabelle 4.10) nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Polymerase durchgeführt.

#### 4.2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Extraktion amplifizierter PCR-Produkte erfolgte entweder direkt mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben oder über eine nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gelelution (Abschnitt 4.2.2.3).

#### 4.2.2.3 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Zur quantitativen sowie qualitativen Analyse von DNA-Fragmenten diente die Elektrophorese über nicht-denaturierende  $0,8 - 1,2 \%$  Agarosegele. Zur Färbung der DNA wurden die Gele mit  $0,1 \mu\text{ml}^{-1}$  Midori Green (Nippon Genetics, Düren) in  $1 \times$  Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Roth) präpariert. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit  $6 \times$  DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific, St. Leon-Rot)

versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer (Roth) bei 120 mA. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter Blaulicht mithilfe des Geldokumentationssystems *Molecular Imager* (Bio-Rad) sichtbar gemacht. Zur weiteren Isolierung der DNA-Fragmente wurden diese unter Blaulicht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und über Verwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben extrahiert.

**6 x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific):**

10 mM        Tris-HCl (pH 7,6)  
 0,03 % (w/v) Bromphenolblau  
 0,03 % (w/v) Xylencyanol  
 60 % (v/v)    Glycerin  
 60 mM        EDTA

**10 x TAE-Puffer (Roth):**

0,4 M        Tris-HCl  
 0,2 M        Essigsäure  
 0,01 M       EDTA; pH 8,3

#### 4.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der amplifizierten und gereinigten DNA erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm unter Verwendung des *NanoDrop ND-2000c* UV/Vis-Spektralphotometers (Peqlab Biotechnologie). Dazu wurde 1 µl der Probe gegen den als Referenz eingesetzten Elutionspuffer des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* vermessen. Die Berechnung des Reinheitsfaktors erfolgte durch die Gerätesoftware anhand des Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA ( $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) und für einzelsträngige RNA ( $40 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz.

#### 4.2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mithilfe des *NucleoSpin Plasmid Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### 4.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt und erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977).

#### 4.2.2.7 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Dafür wurden 200 µl tiefgefrorene, chemisch kompetente Zellen des Stammes *E. coli* DH5α unter ständiger Kühlung für max. 10 min aufgetaut, mit 1 - 5 µl (1 pg - 100 ng) Plasmid-DNA gemischt und für 30 min

auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek und fünfminütiges Abkühlen auf Eis. Anschließend wurde die Zellsuspension mit SOC-Medium (New England Biolabs, Frankfurt am Main) auf 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Platten (Instantmischung von Roth, Karlsruhe) mit dem entsprechenden Antibiotikum appliziert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die resistenten Klone (Transformanten) ausgewählt und über Nacht in LB-Medium bei 37 °C angezogen (Abschnitt 4.2.1.3).

#### 4.2.2.8 Transformation von *Synechocystis*

Die Transformation von *Synechocystis* mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Grigorieva & Shestakov (1982). Für die Transformation wurden *Synechocystis*-Zellen in einer 35 ml Flüssigkultur unter Standardwachstumsbedingungen (bei Dauerlicht, Abschnitt 4.2.1.2) bis zu einer OD<sub>750nm</sub> von 0,8 - 1,0 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 3500 rpm, RT) sedimentiert und in 500 µl Restmedium aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen nach Zugabe von 5 µg Plasmid-DNA für 5 h unter Standardwachstumsbedingungen auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zu je 100 µl und 400 µl auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit einer Antibiotikakonzentration von Cm 10 µg ml<sup>-1</sup> (Abschnitt 4.2.1.2) ausgestrichen. Nach sieben Tagen wurden die transformierten Klone mit einer sterilen Impfähse auf frisches BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit gleichbleibender Antibiotikakonzentration von Cm 10 µg ml<sup>-1</sup> einzeln ausgestrichen. Die Vereinzelung der Transformanten wurde zwei weitere Male wiederholt, bevor die vollständige Segregation mittels Kolonie-PCR (Abschnitt 4.2.2.1) und Sequenzierung (Abschnitt 4.2.2.6) überprüft wurde.

#### 4.2.2.9 Konjugation von *Synechocystis*

Die Konjugation von *Synechocystis* erfolgte über den natürlichen Vorgang des konjugativen Gentransfers bei Cyanobakterien. Für diesen Mechanismus wurde neben dem Rezipienten (*Synechocystis*) ein Helferstamm (*E. coli* J53 mit dem Helferplasmid RP4) und ein *Cargo*-Plasmid, der in *Synechocystis* autonom replizierende *shuttle*-Vektor pVZ321, verwendet. *E. coli* Dh5α-Zellen dienen als Donorstamm für das Plasmid.

Zur Vorbereitung der Konjugation von *Synechocystis* wurde zunächst eine Transformation von Dh5α-Zellen mit dem pVZ321-Vektor durchgeführt (Abschnitt 4.2.2.7). Im Anschluss wurden die Transformanten über Nacht bei 37 °C und 250 rpm in LB-Medium inkubiert. Parallel dazu wurden Zellen des *E. coli* J53-Stammes über Nacht in LB-Medium kultiviert. Jeweils 50 ml LB-Medium wurden zum einen 1:40 mit der Dh5α-pVZ321-Übernachtskultur und zum anderen 1:40 mit der J53-Übernachtskultur inokuliert und für 2,5 h bei 37 °C und 250 rpm in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Die Zellen des Dh5α-pVZ321-Donorstammes wurden anschließend für 10 min bei 4800 rpm und RT sedimentiert. Nach Überführen von 50 ml der Zellen des J53-Helferstammes auf das Dh5α-pVZ321-Pellet erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 4800 rpm, RT). Das Pellet mit den nun vereinten Ansätzen wurde in 40 ml LB-Medium aufgenommen und ein weiteres Mal unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml LB-Medium gelöst

und für 2,5 h bei 30 °C inkubiert. Bei diesem *mating* wurde die Übertragung des Plasmids RP4 aus dem Helferstamm in den Donorstamm ermöglicht.

Zur weiteren Vorbereitung wurde eine *Synechocystis*-Kultur in 30 ml BG11-Medium unter den in Abschnitt 4.2.1.2 beschriebenen Wachstumsbedingungen (Normallicht) mit den entsprechenden Antibiotika bis zu einer OD<sub>750nm</sub> von 0,6 – 1,0 angezogen. Anschließend wurden 15 ml dieser Kultur zentrifugiert (3 min, 4800 rpm, RT) und dreimal mit 50 ml antibiotikafreiem BG11-Medium gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf eine OD<sub>750nm</sub> von 0,6 – 0,8 eingestellt.

Für die Konjugation von *Synechocystis* wurden 200 µl der vorbereiteten *Synechocystis*-Kultur mit 200 µl der Dh5α-pVZ321-J53-Mischkultur vereinigt. 200 µl des Konjugationsansatzes wurden auf einen HATF-Filter überführt, der auf einer BG11-Platte (0,75 % Agar, ohne Antibiotikum) appliziert war, und mit einer sterilen Impföse ausgestrichen. Die Platten wurden zunächst im Dunkeln bei 30 °C über Nacht inkubiert und ab dem folgenden Tag unter Dauerlichtbedingungen (Abschnitt 4.2.1.2) inkubiert. Nach 24 h wurden die Filter steril auf BG11-Festmedium mit den jeweiligen Antibiotika (0,75 % Agar) überführt. Nach etwa vier Tagen wurden die Zellen mit BG11-Medium von dem Filter gespült und auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar, mit den entsprechenden Antibiotika) appliziert. Zwei Wochen später wurden einzelne resistente Klone ausgewählt und auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar, mit einer etwas erhöhten Antibiotikakonzentration; Abschnitt 4.2.1.2) überführt.

### 4.2.3 Biochemische Methoden zur RNA-Analytik

#### 4.2.3.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *Synechocystis*

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus *Synechocystis*-Zellen erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Dafür wurden 25 ml einer Flüssigkultur in ein mit Eis gefülltes 50 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 4.000 rpm (Rotor: TX-750, Thermo Fisher Scientific) für 5 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet im restlichen Überstand (ca. 1 ml) resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C für 2 min wurde das Zell-Sediment in 1 ml gekühltem Trizol-Reagenz (Invitrogen) gelöst, unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die gefrorenen Proben bei 65 °C für 15 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (CI; zuvor bei -20 °C gekühlt) und sorgfältigem Schütteln mit der Hand für 30 sek wurden die Ansätze zur Phasentrennung für 10 min bei 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) einem weiteren Extraktionsschritt unterzogen. Hatte sich nach der Zentrifugation eine weiße Interphase gebildet, so wurde der Extraktionsschritt mit 1 Volumen PCI wiederholt. Ein letzter Extraktionsschritt erfolgte mit 1 Volumen CI unter den entsprechenden Bedingungen. Anschließend wurde zur Fällung der RNA die wässrige Phase in 1 Volumen 2-Propanol (Roth) + 10 µl Na-Acetat (3 M, pH 5,2) aufgenommen und über Nacht bei -20 °C



inkubiert. Die RNA wurde für 45 min bei 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C pelletiert, anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol (zuvor bei -20 °C gekühlt) gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11), 4 °C). Das Pellet wurde bei RT für 15 min getrocknet und in 20 - 50 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O (Roth) gelöst. Während aller Arbeitsschritte wurden die Proben auf Eis gehalten. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (Abschnitt 4.2.2.4).

**CI:** Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), (Sigma-Aldrich)

**PCI:** Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), (Roth)

#### 4.2.3.2 Denaturierende Elektrophorese von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar-Blotting

Die denaturierende Auftrennung von RNA über ein 1,3%iges Formaldehyd-Agarosegel wurde zum einen verwendet, um nach erfolgter Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 4.2.3.1) die Qualität der RNA zu überprüfen. Zum anderen wurde diese Methode gewählt, wenn RNA-Moleküle mit einer Länge von über 500 nt aufgetrennt werden sollten. Zur Vorbereitung wurde ein definiertes Volumen oder Konzentration der RNA-Proben mit 2 x RNA-Ladepuffer + EtBr (Thermo Scientific) versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die Ansätze wurden auf ein horizontales Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und bei 90 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x MEN-Puffer. Neben den RNA-Proben wurden zur besseren Zuordnung der Banden zwei unterschiedliche Größenstandards (*RiboRuler Low Range RNA Ladder*, Thermo Scientific oder *RiboRuler High Range RNA Ladder*, Thermo Scientific) aufgetragen. Die RNA-Banden wurden anschließend am *Molecular Imager* (Bio-Rad) durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur weiteren Verwendung wurde die RNA anschließend mittels Kapillartransfer auf eine *Hybond-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert. Dafür wurden die beiden Vertiefungen einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 10 x SSC-Puffer gefüllt und durch eine Brücke aus Filterpapier (Whatman) miteinander verbunden. Auf das Papier wurde das Agarose-Gel (Oberseite nach oben), die mit 10 x SSC befeuchtete Nylonmembran, vier Lagen mit 10 x SSC getränktem Filterpapier und ein etwa 4 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern gelegt. Der Stapel wurde gleichmäßig mit einer Platte und einem schweren Gegenstand beschwert. Der Transfer erfolgte für ca. 16 h über Nacht, woraufhin die Membran kurz in 2 x SSC geschwenkt wurde. Zur Quervernetzung der RNA mit der Membran wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker 1800, Stratagene). Die Lagerung der getrockneten Membran erfolgte bei RT. Die Membran konnte anschließend zur Hybridisierung mit radioaktiven (Abschnitt 4.2.3.7) oder nicht-radioaktiven Sonden (Abschnitt 4.2.3.9) genutzt werden.

**2 x RNA-Ladepuffer + EtBr, (Thermo Scientific):**

95 % (v/v)	Formamid
0,025 % (w/v)	SDS
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
0,025 % (w/v)	Xylencyanol
0,025 % (v/v)	Ethidiumbromid
0,5 mM	EDTA

**Formaldehyd-Agarosegel:**

1,3 % (w/v)	Agarose
5 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)
1 x (w/v)	MEN-Puffer

**10 x MEN-Puffer:**

200 mM	MOPS
10 mM	EDTA (pH 7,0)
50 mM	Na-Acetat

**20 x SSC:**

3 M	NaCl
3 mM	Na-Citrat
pH 7	

## 4.2.3.3 Denaturierende Elektrophorese von RNA in Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Die denaturierende Elektrophorese von RNA über Harnstoff-Polyacrylamidgele erfolgte zur Analyse von Molekülen, die weniger als 500 Nukleotide umfassen. Die RNA-Proben wurden mit 2 x RNA-Ladepuffer + EtBr (Thermo Scientific) versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Je nach Größe der zu analysierenden RNA wurde ein 8%iges, ein 10%iges oder ein 12%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel präpariert. Neben den RNA-Proben wurde ein Größenstandard (*RiboRuler Low Range RNA Ladder*, Thermo Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 - 25 mA in 1 x TBE-Laufpuffer für ca. 1,5 h in einer vertikalen Elektrophoresekammer. Das Gel wurde anschließend in Färbelösung mit GelRed (Biotium) oder SYBR Gold (Thermo Scientific) für 10 min geschwenkt und für wenige Sekunden in 1 x TBE-Puffer gewaschen. Die RNA-Banden wurden am *Molecular Imager* (Bio-Rad) durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend mittels Elektro-Blotting auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Abschnitt 4.2.3.4).

**10 x TBE-Puffer, (Roth):**

1 M	Tris-Borat
20 mM	EDTA
in dH <sub>2</sub> O	
pH 8,3	

**Harnstoff-Polyacrylamidgel (10 %):**

10 % (v/v)	Rotiphorese Gel 40, Acrylamid / Bisacrylamid (19:1), (Roth)
8,3 M	Harnstoff
10 % (v/v)	10 x TBE-Puffer, (Roth)
0,8 % (v/v)	APS
0,1 % (v/v)	TEMED

**Färbelösung:**

GelRed:	0,03 % (v/v) GelRed Nucleic Acid Gel Stain (10.000 X), (Biotium)
	99,97 % (v/v) 0,5 x TBE-Puffer

SYBR Gold:	0,01 % (v/v) SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000 x), (Thermo Scientific)
	99,99 % (v/v) 0,5 x TBE-Puffer

## 4.2.3.4 Elektro-Blotting von RNA (Northern Blot)

Nach elektrophoretischer Auftrennung (Abschnitte 4.2.3.2 und 4.2.3.3) wurde die RNA mittels Elektro-Blotting im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine *Hybond-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert. Der Blotting-Aufbau, beginnend auf der Anode, bestand aus einem in 0,5 x TBE-Puffer getränkten Filterpapier (Whatman), der Nylonmembran, dem Harnstoff-Polyacrylamidgel und einem weiteren getränkten Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 45 - 60 min bei 2 mA cm<sup>-2</sup> Gel. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) wurde die RNA mit der Nylonmembran quervernetzt. Der Transfer wurde anschließend mithilfe des Geldokumentationssystems *Molecular Imager* (Bio-Rad) überprüft. Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung bei RT trocken aufbewahrt.

4.2.3.5 *In vitro*-Transkription und Reinigung von RNA

*In vitro*-Transkriptionen von RNA-Molekülen mit einer Sequenzlänge von mehr als 200 nt wurden mithilfe des *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kits* (Epicentre) durchgeführt. Für RNA-Moleküle mit einer Sequenzlänge von weniger als 200 Nukleotide wurde das *MEGAscript T7 Transcription Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Zuvor wurden PCR-Fragmente generiert, die für die Reaktion als DNA-Matrizen dienten. In Tabelle 4.6 sind die verwendeten Primer aufgelistet. Der *in vitro*-Transkriptions-Reaktionsansatz wurde für 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transkriptionsansatz (20 µl) mit 2 x RNA-Ladepuffer + EtBr (Thermo Scientific) versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und über eine Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die RNA-Banden wurden anschließend an dem Geldokumentationssystem *Molecular Imager* (Bio-Rad) mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und über Nacht in 50 µl RNA-Präparationspuffer bei 4 °C und unter Schütteln (1000 rpm) gelöst. Durch eine kurze Zentrifugation (1 min bei 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C) wurden die Gelstücke sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit weiteren 50 µl RNA-Präparationspuffer gemischt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol aufgefüllt,

für 1 min mittels Vortexen gut durchmischt und anschließend für 5 min bei 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Abschnitt 4.2.3.1) isoliert. Die Fällung erfolgte in 1 Volumen Ethanol/Na-Acetat (3 M, pH 5,2; im Verhältnis 30:1) für 3 h bei -20 °C. Nach 30-minütiger Zentrifugation (14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11), 4 °C) wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend an der Luft bei RT getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch am *NanoDrop ND-2000c* UV/Vis-Spektralphotometer (PqLab Biotechnologie) bestimmt.

**RNA-Präparationspuffer:**

50 mM    Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 50 mM    NaHCO<sub>3</sub>  
 pH 9,5

**TE-Puffer:**

10 mM    Tris/HCl, pH 8,0  
 1 mM    EDTA

#### 4.2.3.6 Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Northern Blot-Hybridisierungen

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte zum einen durch die Synthese spezifischer RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription unter Verwendung von [α P<sup>32</sup>]-UTP. Dabei wurde, je nach Länge der zu synthetisierenden RNA, das Reaktions-Kit *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kits* (Epicentre) oder das *MEGashortscript T7 Transcription Kit* (Thermo Scientific) eingesetzt. Als DNA-Matrizen dienten PCR-Fragmente, welche mit den in Tabelle 4.6 aufgelisteten Primern generiert wurden. Die Reaktionsansätze erfolgten nach den Angaben der Hersteller, mit der Ausnahme, dass pro 20 µl Reaktionsansatz 3 µl [α P<sup>32</sup>]-UTP und jeweils 0,8 µl 10 mM ATP, CTP und GTP eingesetzt wurden. Anschließend folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C und ein 15-minütiger DNase-Verdau. Überschüssige, nicht-eingebaute Nukleotide wurden per Gelfiltration über *illustra MicroSpin G-50-Säulen* (GE Healthcare) entfernt.

Eine weitere Methode zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden stellte die [<sup>32</sup>P]-Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Oligonukleotiden dar. Ein Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl einer 10 µM Stammlösung des zu markierenden Oligonukleotids, 11,5 µl Nuklease-freiem dH<sub>2</sub>O, 2 µl 10 x Polynukleotidkinasepuffer A, 3 µl [γ <sup>32</sup>P]-ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase und wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

#### 4.2.3.7 Northern Blot-Hybridisierung (radioaktiv)

Die Nylonmembran (Abschnitt 4.2.3.4) wurde kurz in 2 x SSC-Lösung geschwenkt und anschließend in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Seite mit der quervernetzten RNA nach innen zeigt. Für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (Abschnitt 4.2.3.6) erfolgte die Prähybridisierung der Membran in 15 ml Hybridisierungspuffer in einem Hybridisierungssofen für 1 h bei 42 °C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit der DNA-Sonde (Abschnitt 4.2.3.6) zu dem Hybridisierungspuffer in das Röhrchen gegeben und für mindestens 5 h oder über Nacht bei 52 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Ungebundene oder unspezifisch gebundene DNA-Sonden wurden durch 3-maliges Waschen (10 min in Waschpuffer I bei 42 °C, 5 min in Waschpuffer II bei 42 °C und wenige Sekunden in Waschpuffer III bei RT) entfernt.

Für die Verwendung einer per *in vitro*-Transkription hergestellten, radioaktiv markierten RNA-Sonde (Abschnitt 4.2.3.6) wurde die Nylonmembran zunächst für 1 h bei 65 °C in 10 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert und im Anschluss, nach Zugabe der radioaktiv markierten RNA-Sonde, über Nacht bei 62 bis 68 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der zu detektierenden RNA. Im Anschluss wurden ungebundene und unspezifisch gebundene RNA-Sonden durch stringentes Waschen (15 min in Waschpuffer IV bei RT, 15 min in Waschpuffer IV bei 68 °C und 5 min in Waschpuffer III bei 68 °C) entfernt.

Die radioaktiven Signale wurden mithilfe des *Personal Molecular Imager FX* (Bio-Rad) detektiert und anschließend mit der Software *Quantity One* (Bio-Rad) analysiert.

##### Hybridisierungspuffer:

50 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
7 % (w/v)	SDS
120 mM	Na-Phosphatpuffer (pH 7,2); hergestellt aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ und $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
250 mM	NaCl

**Waschpuffer I:** 2 x SSC; 1 % (w/v) SDS

**Waschpuffer II:** 1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS

**Waschpuffer III:** 0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

**Waschpuffer IV:** 2 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS

Das Entfernen (*Stripping*) gebundener DNA-Sonden erfolgte durch Waschen der Nylonmembran mit heißer 0,1 % (w/v) SDS-Lösung bei 42 °C. RNA-Sonden wurden durch 20-minütige Inkubation mit 0,1 % (w/v) SDS-Lösung bei 80 °C von der Nylonmembran entfernt. Im Anschluss wurde die Nylonmembran zweimal in 2 x SSC-Lösung geschwenkt und bis zur nächsten Verwendung trocken bei RT aufbewahrt.

#### 4.2.3.8 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden für Northern Blot-Hybridisierungen

Die Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden per *in vitro*-Transkription erfolgte unter Verwendung des *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kits* (Epicentre) und des *DIG Northern Starter Kits* (Roche) nach Angaben der Hersteller. Als DNA-Matrizen dienten PCR-Fragmente, welche zuvor mit den in Tabelle 4.6 aufgelisteten Primern generiert wurden. Ein 20 µl *in vitro*-Transkriptionsansatz beinhaltete 11,5 µl *DNA-Template*, 2 µl *AmpliScribe T7-Flash 10X Reaction Buffer*, 2 µl *DIG RNA Labeling Mix*, 2 µl 100 mM DTT, 0,5 µl RiboGuard RNase Inhibitor und 2 µl *AmpliScribe T7-Flash Enzyme Solution*. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die weitere Durchführung erfolgte wie vom Hersteller im Protokoll des *DIG Northern Starter Kits* (Roche) beschrieben.

#### 4.2.3.9 Northern Blot-Hybridisierung (Digoxigenin)

Northern Blot-Hybridisierungen mit einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde (Abschnitt 4.2.3.8) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Hybridisierung der Nylonmembran (Abschnitt 4.2.3.4) erfolgte in *DIG Easy Hyb* (*DIG Northern Starter Kit*, Roche; 10 ml / 100 cm<sup>2</sup> Nylonmembran) über Nacht bei 68 °C unter ständiger Rotation. Nach Inkubation mit CDP-*Star* (Sigma-Aldrich) konnte die mit Digoxigenin-markierte RNA durch Aufnahme der Signale am *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad) detektiert werden. Die Analyse der RNA-Banden erfolgte mit der Software *Image Lab* oder *Quantity One* (beide von Bio-Rad).

#### 4.2.3.10 Nichtdenaturierende PAGE und Elektro-Blotting zur Detektion kleiner RNA-Moleküle / pRNAs

Für die Detektion sehr kleiner RNA-Moleküle ( ~ 10 - 50 Nukleotide) kam eine von Beckmann *et al.* (2010) und Hoch *et al.* (2016) beschriebene Methode zur Anwendung. In diesem Fall wurde die Methode zur Detektion der pRNAs aus *Synechocystis* genutzt. Dafür wurden jeweils 15 µg Gesamt-RNA (Abschnitt 4.2.3.1) mit denaturierendem 2 x RNA-Ladepuffer versetzt, für 2 min bei 95 °C erhitzt und anschließend wenige Minuten auf Eis abgekühlt. Die Ansätze wurden anschließend über ein 20%iges natives Polyacrylamidgel bei 25 mA für ca. 2,5 h in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Bio-Rad) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TBE (Abschnitt 4.2.3.3). Im Anschluss wurde das Gel zum Anfärben der RNA für 10 min in einer GelRed-Lösung (Abschnitt 4.2.3.3) geschwenkt, kurz in 0,5 x TBE-Puffer gewaschen und durch Bestrahlung mit UV-Licht am *Molecular Imager* (Bio Rad) dokumentiert. Die RNA wurde durch Elektro-Blotting (Abschnitt 4.2.3.4) über Nacht (ca. 16 h) bei 0,25 mA cm<sup>-2</sup> Gel unter Verwendung von 0,5 x TBE-Puffer auf eine *Hybond-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert. Der Transfer wurde anschließend durch Färbung des Gels mit GelRed-Lösung (Abschnitt 4.2.3.3) und durch Verwendung des Geldokumentationssystems *Molecular Imager* (Bio-Rad) überprüft. Direkt im Anschluss wurde die RNA chemisch auf der Membran vernetzt (*crosslinking*). Dafür wurde die feuchte Membran auf ein mit EDC-Lösung getränktes Filterpapier gelegt und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Nach dem chemischen *Crosslinking* erfolgte die Prähybridisierung der Membran mit 15 ml

des Hybridisierungspuffers *DIG Easy Hyb* (Roche) in einem geeigneten Hybridisierungsröhrchen unter ständiger Rotation für 2 h bei 51 °C. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 51 °C über Nacht in 15 ml Hybridisierungspuffer *DIG Easy Hyb* und 300 pmol pRNA-Sonde (30-mer, RNA/LNA-Oligonukleotid mit einer Digoxigenin-Modifizierung am 5' und 3'-Ende; Tabelle 4.6). Zuvor wurde die pRNA-Sonde für 1 min bei 95 °C erhitzt und direkt auf Eis abgekühlt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran folgendermaßen bei RT gewaschen: 2 min mit 50 ml Waschpuffer V (2 x SSC, 0,1 % SDS) und 15 min mit 50 ml Waschpuffer III (0,1 x SSC, 0,1 % SDS; Absatz 4.2.3.7). Die immunologische Detektion mit dem *DIG Northern Starter Kit* (Roche) erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **2 x RNA-Ladepuffer:**

2,6 M            Harnstoff  
66 % (w/v)    Formamid (deionisiert)  
10 % (v/v)     10 x TBE-Puffer  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

#### **Natives Polyacrylamidgel (20 %):**

20 % (v/v)    Rotiphorese Gel 40, Acrylamid / Bisacrylamid (19:1), (Roth)  
10 % (v/v)    10 x TBE-Puffer, (Roth)  
0,8 % (v/v)   APS  
0,1 % (v/v)   TEMED

#### **EDC-Lösung:**

312 mM    1-Methylimidazol, pH 8,0 mit HCl  
0,75 g     1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)  
Direkt vor der Verwendung wurden 0,75 g EDC zu 9 ml 1-Methylimidazol (312 mM, pH 8,0) gegeben und auf 24 ml mit DEPC-Wasser aufgefüllt.  
Endkonzentration: 130 mM 1-Methylimidazol, 160 mM EDC

#### **Waschpuffer V: 2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS**

#### 4.2.3.11 *Microarray*-Hybridisierung und Auswertung

Für die *Microarray*-Hybridisierung wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus *Synechocystis* (4.2.3.1) verwendet. Das *Microarray*-Design sowie die Durchführung der *Microarray*-Hybridisierung und das Auslesen der Daten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hess (Institut für Biologie III, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) nach der in Georg *et al.* (2009) beschriebenen Methode. Die Berechnung der *Foldchanges* und der P-Werte aus den Rohdaten wurde von Herrn Dr. Jens Georg (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hess, Institut für Biologie III, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) mit *limma* (*linear models for microarray data*) mit der Software R durchgeführt (Ritchie *et al.*, 2015). Eine weiterführende statistische Analyse wurde ebenfalls von Herrn Dr. Jens Georg vorgenommen (Heilmann *et al.*, 2017). Die Daten daraus wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet und sind in Abschnitt 2.2.7.2 beschrieben. Die graphische Visualisierung der

Genexpressionsdaten mittels *Volcano plot* (Abschnitt 2.2.7.2.1) sowie einzelner Kinetiken im zeitlichen Verlauf (Abschnitt 2.2.7.2.3) erfolgte mit der Software Excel. Für die Erstellung der *Heatmap* (Abschnitt 2.2.7.2.4) wurde das Programm *Multiple Experiment Viewer* der Online-Software *TM4 Software Suite* verwendet (Saeed *et al.*, 2003). Negative Genexpressionswerte sind durch eine grüne Färbung und positive Werte sind durch eine rote Färbung dargestellt.

#### 4.2.4 Biochemische Methoden zur Protein-Analytik

##### 4.2.4.1 Zellernte und -aufschluss von *Synechocystis*

*Synechocystis*-Flüssigkulturen wurden bei 3.500 rpm (Rotor: TX-750, Thermo Fisher Scientific) und RT für 10 min sedimentiert. Die pelletierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Für den Zellaufschluss wurden die sedimentierten *Synechocystis*-Zellen in einem Verhältnis von 1 : 3 (Pelletvolumen : Puffervolumen) in Thylakoidpuffer aufgenommen und mit einem Volumen von 1 : 3 (Glasperlenvolumen : Puffervolumen) mit Glasperlen (0,1 mm und 0,25 - 0,5 mm, 1 : 1 gemischt) aufgefüllt. Für die Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurde die Zellsuspension anschließend in einer Zelmühle (Retsch) bei 30 Hz für 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment, bestehend aus Zellen und Glasperlen, wurde erneut mit Thylakoidpuffer versetzt und einem weiteren Aufschlussschritt in der Zelmühle unterzogen. Nachdem beide Überstände vereinigt wurden, wurden diese bei 4 °C und 3.500 rpm (Rotor: TX-750, Thermo Fisher Scientific) für 5 min zentrifugiert, um Glasperlen, Zellbestandteile und nichtaufgeschlossene Zellen zu sedimentieren. Der gewonnene Überstand (Gesamtzellextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Fraktionierung von löslichen Proteinen und Membranbestandteilen wurde durch Zentrifugation des Gesamtzellextraktes für 30 min bei mindestens 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C vollzogen.

##### **Thylakoidpuffer:**

- 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,5
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 25 mM CaCl<sub>2</sub>
- 50 mM EDTA, pH 8,0
- 10 % (v/v) Glycerol
- 1 Tablette 10 ml<sup>-1</sup> Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
- 1 Tablette 10 ml<sup>-1</sup> Protease-Inhibitor-Cocktail

##### 4.2.4.2 Herstellung von Zelllysaten für Pigmentbestimmungen

Für die Herstellung von Zelllysaten für Pigmentbestimmungen wurden 20 ml *Synechocystis*-Flüssigkultur für 5 min bei 3.500 rpm (Rotor: TX-750, Thermo Fisher Scientific) und 4 °C pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.



Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert und mit einem Volumen von 1 : 1 (Glasperlenvolumen : Puffervolumen) mit Glasperlen (0,1 mm und 0,25 – 0,5 mm, 1 : 1 gemischt) aufgefüllt. Der Ansatz wurde in einer Zelmühle (Precellys 24) für 2 x 30 sek bei 4 °C geschüttelt und anschließend für 2 min bei 4.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment, bestehend aus Zellen und Glasperlen, wurde erneut mit 200 µl PBS-Puffer versetzt und einem weiteren Extraktionsschritt in der Zelmühle unterzogen. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt (Gesamtzellextrakt). Für die Herstellung von löslichen Proteinfractionen wurden 200 µl des Gesamtzellextraktes für 30 min bei 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinproben wurden während aller Arbeitsschritte auf Eis gehalten.

**PBS-Puffer:**

140 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 1,8 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 pH 7,4

#### 4.2.4.3 Herstellung von Zelllysaten für *in vivo-pulldown* Analysen

Die für *in vivo-pulldown* Analysen verwendeten Zelllysate wurden aus je 50 ml sedimentierten Zellen hergestellt. Die Zellen wurden zuvor unter Standardbedingungen, unter stickstofffreien Bedingungen und unter stickstoffsupplementierten Bedingungen angezogen (Abschnitte 4.2.1.2, 4.2.1.8 und 4.2.1.9). Die Zelldichte betrug zum Zeitpunkt der Zellernte 0,7 - 1,0 OD<sub>750nm</sub>. Die pelletierten Zellen wurden in 370 µl 1 x Binde-/Waschpuffer aufgenommen und mit einem Volumen von 1 : 1 (Glasperlenvolumen : Puffervolumen) mit Glasperlen (0,1 mm und 0,25 – 0,5 mm, 1 : 1 gemischt) aufgefüllt. Zusätzlich wurde den Ansätzen jeweils 5 µl DNase und 5 µl RNase (100 µg ml<sup>-1</sup> in 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0) hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend durch 10-maliges Mischen auf einem Vortexer für jeweils 1 min aufgeschlossen. Zwischen den Schritten wurden die Zellen auf Eis kühl gehalten. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei 14.000 rpm sedimentiert und der Überstand (Gesamtzellextrakt) abgenommen. Zur weiteren Fraktionierung der löslichen Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen wurde der Gesamtzellextrakt für 15 min bei 20.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration der löslichen Proteine wurde, wie in Abschnitt 4.2.4.11 beschrieben, bestimmt.

**1 x Binde-/Waschpuffer:**

50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 8,0  
 300 mM NaCl  
 0,01 % (v/v) TWEEN-20  
 1 Tablette 20 ml<sup>-1</sup> Protease-Inhibitor-Cocktail

#### 4.2.4.4 Bestimmung des Phycobiliproteingehalts

Zur Bestimmung des Phycobiliproteingehalts wurde der Phycocyanin (PC)- und der Allophycocyaningehalt (AP) ganzer Zellen spektrophotometrisch ermittelt. Dazu wurden 50 µl der löslichen Proteinfraction (Abschnitt 4.2.4.2) in einer Plastikküvette auf 1 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und im Spektralphotometer (Specord200 Plus) bei 620 nm und 650 nm bei RT vermessen. Als Referenz wurde dH<sub>2</sub>O verwendet. Der Gehalt von PC und AP wurde nach der Formel von Tandeau de Marsac & Houmard (1988) berechnet:

$$PC [mg\ ml^{-1}] = \frac{OD_{620nm} - 0,7 * OD_{650nm}}{7,38}$$

$$AP [mg\ ml^{-1}] = \frac{OD_{650nm} - 0,19 * OD_{620nm}}{5,65}$$

#### 4.2.4.5 Bestimmung des Chlorophyll *a*-Gehalts

Die Bestimmung des Chlorophyll *a*-Gehalts ganzer *Synechocystis*-Zellen erfolgte durch Extraktion mit 90 % (v/v) Methanol nach Tandeau de Marsac & Houmard (1988). Dafür wurde 1 ml Flüssigkultur für 5 min bei 14.000 rpm (Zentrifuge: 5424 R, Eppendorf, Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden 900 µl des Überstands verworfen und das Pellet in den restlichen 100 µl des Überstands resuspendiert. Nach Zugabe von 900 µl Methanol wurde der Ansatz für mindestens 30 min im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung von Membranbestandteilen wurde die Suspension für 5 min bei 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei einer Wellenlänge von 665 nm gegen 90 % (v/v) Methanol spektrophotometrisch vermessen. Der Chlorophyll *a*-Gehalt wurde anhand des Extinktionskoeffizienten berechnet:

$$Chl\ a\ [\mu g\ ml^{-1}] = OD_{665nm} * 13,9$$

#### 4.2.4.6 Bestimmung des Glykogengehalts

Die Bestimmung des Glykogengehalts basiert auf der Methode von Keppler & Decker (1974) sowie auf den Modifikationen von Gründel *et al.* (2012). Hierbei wird der enzymatische Abbau von Glykogen durch Amyloglucosidase (Sigma-Aldrich) gemessen. Zu diesem Zweck wurden zu den im Abschnitt 2.2.7.1.3 vermerkten Zeitpunkten 0,5 - 1,5 ml von *Synechocystis*-Flüssigkulturen aliquotiert und mit 200 µl KOH (30 %) ml<sup>-1</sup> gemischt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 95 °C geschüttelt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Die Fällung des Glykogens wurde durch Zugabe von EtOH (98 %, kalt), gründlichem Mischen und einer Inkubation von mindestens 90 min auf Eis gewährleistet. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (bei 4 °C und 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11)) wurde der Überstand

abgenommen und das Pellet zunächst mit 1 ml EtOH (70 %, kalt) und dann mit EtOH (98 %, kalt) gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt (bei 4 °C und 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11)). Durch Inkubation für 5 - 10 min bei 60 °C wurde das Pellet getrocknet und im Anschluss in 100 µl Na-Acetatpuffer inkl. AMG aufgenommen und gemischt. Der Glykogenabbau zu Glukose wurde durch eine 3 - 4 stündige Inkubation bei 60 °C (unter Schütteln) vorgenommen. Bevor die Glukosemenge spektrophotometrisch vermessen wurde, wurde der Ansatz für 2 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert.

Für die Glykogenbestimmung einzelner, weniger Proben wurde die Messung in Küvetten durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 µl des Überstandes mit 990 µl Hexokinase-Lösung in einer Glasküvette gemischt und direkt bei 340 nm am Spektralphotometer (Specord200 Plus) vermessen ( $E_1$ ). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz erneut spektrophotometrisch vermessen ( $E_2$ ). Ein Ansatz aus 990 µl Hexokinase-Lösung und 10 µl dH<sub>2</sub>O diente jeweils als Leerwert.

Bei Versuchen mit einer großen Anzahl an Proben wurde die spektrophotometrisch Messung in 96-Well Mikrotiterplatten am Plattenleser (BMG FLUOstar optima, BMG Labtech GmbH) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 340 µl der Hexokinase-Lösung pro Well vorgelegt. Nach Zugabe von 20 µl Probe erfolgte die Messung von  $E_1$  und nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde  $E_2$  bei 340 nm bestimmt.

Als Standard diente eine 5 mM Glukose-Lösung, welche parallel zu den Proben vermessen wurde.

**30 % KOH:** 30 % (w/v) Kaliumhydroxid

**98 % EtOH:** 98 % (v/v) Ethanol

**70 % EtOH:** 70 % (v/v) Ethanol

**Na-Acetatpuffer inkl. AMG:** 100 µl Amyloglucosidase (25 mg ml<sup>-1</sup>) auf 900 µl Natrium-Acetatpuffer (100 mM, pH 4)

**Hexokinase-Lösung:** Infinity Glucose hexokinase Liquid Stable Reagent (Thermo Scientific) 1:1 mit 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5, gemischt

**Glukose-Lösung:** 5 mM Glukose (1 mg Glukose in 1 ml Natrium-Acetatpuffer (100 mM, pH 4))

Die ermittelten Werte wurden zur Bestimmung von  $\Delta E$  in die folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta E = (E_2^{Probe} - E_1^{Probe}) - (E_2^{Leer} - E_1^{Leer})$$

Die Berechnung des Glykogengehalts erfolgte nach der folgenden Formel:

$$Glykogen[mg\ ml^{-1}] = \frac{\Delta E * VG * MG}{\epsilon_{NADH} * d * VP}$$

Die einzelnen Variablen im Überblick:

$VG$  = Gesamtvolumen

$MG$  = Molekulargewicht Glukose

$\epsilon_{NADH}$  = Absorptionskoeffizient  $NADH_{340nm}$  ( $6200 M cm^{-1}$ )

$d$  = Schichtdicke in cm

$VP$  = Probenvolumen

#### 4.2.4.7 Isolation His-fusionierter Proteine mittels magnetischer Kügelchen (*Dynabeads*) – *in vivo-pulldown*-Analysen

Die Reinigung der His-fusionierten RNA Polymerase aus den *Synechocystis*-Mutanten WT-RNAP-HIS und  $\Delta$ *ssaA*-RNAP-HIS (Abschnitt 4.1.1.2) erfolgte nach der Methode von Koskinen *et al.* (2016). Bei dieser Methode kamen magnetische Kügelchen (*Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown*, Thermo Scientific) zur Anwendung, deren Oberfläche mit einer Kobalt-basierten Metallchelatchromatographie-Beschichtung versehen ist. Für jeden Ansatz wurden jeweils 50  $\mu$ l *Dynabeads* aliquotiert. Zur Entfernung des Lagerpuffers wurden die Aliquote auf einen Magneten (Millipore) gestellt und der Überstand abgenommen. Die *Dynabeads* wurden mit einem definierten Volumen der Proteinlösung (900  $\mu$ g Protein, Abschnitt 4.2.4.3) gemischt und für 5 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze auf einen Magneten platziert und der Überstand abgenommen und aufbewahrt (Überstand 1). Die *Dynabeads* wurden viermal mit 600  $\mu$ l 1 x Binde-/Waschpuffer (Abschnitt 4.2.4.3) gewaschen. Dabei wurde die Suspension zwischen den Waschschritten jeweils für 2 min an einen Magneten gehalten, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Der Überstand des letzten Waschschriffs wurde aufbewahrt (4. Wasch). Die Bindung der His-fusionierten Proteine an die magnetischen Kügelchen wurde durch Zugabe von 75  $\mu$ l His-Elutionspuffer und fünfminütigem Schütteln bei RT aufgelöst. Der Ansatz wurde für 2 min auf einen Magneten appliziert und der Überstand abgenommen (Eluat). Alle Schritte erfolgten auf Eis, sofern nicht anders vermerkt.

##### **His-Elutionspuffer:**

300 mM	Imidazol
50 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 8,0
300 mM	NaCl
0,01 % (v/v)	TWEEN-20

#### 4.2.4.8 DOC/TCA-Fällung von Proteinen

Zur Proteinbestimmung nach Lowry (Abschnitt 4.2.4.10) wurden die in Lösung befindlichen Proteine zunächst mittels DOC/TCA-Fällung aufkonzentriert (Bensadoun & Weinstein, 1976). Proteinhaltige Lösungen wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 1 ml aufgefüllt, mit 25  $\mu$ l 2 % (w/v) DOC versetzt, gut durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 30  $\mu$ l 40 % (v/v) TCA-Lösung zugegeben, der

Ansatz erneut gemischt und die gefällten Proteine pelletiert (bei 14.000 rpm (Rotor: FA-45-24-11) und 4 °C für 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet.

Für die Konzentrationsbestimmung nach Lowry wurden die Proteine anschließend für mindestens 30 min in 100 µl 1 M NaOH bei RT in Lösung gebracht.

Für die weitere Analyse der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.12) wurde das Pellet in 3 Volumenteilen ChuaA und 2 Volumenteilen ChuaB für 5 min bei 95 °C gelöst. Zur Vorbereitung für die Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE wurden die Proben kurz anzentrifugiert (bei 14.000 rpm für 1 min bei RT).

**2 % DOC:** 2 % (w/v) Desoxycholsäure Natriumsalz

**40 % TCA:** 40 % (v/v) Trichloressigsäure (aus 100 % (w/v) TCA)

**ChuaA:** 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
100 mM DTT

**ChuaB:** 5 % (w/v) SDS  
30 % (w/v) Saccharose  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

#### 4.2.4.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von in Lösung befindlichen Proteinen erfolgte durch eine kolorimetrische Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976). Dafür wurde ein Teil der zu analysierenden Probe mit Bradford-Reagenz (Quick Start Bradford 1 x Dye, Bio-Rad, München) auf 1 ml aufgefüllt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm an einem Spektralphotometer (Specord200 Plus) gemessen. Als Referenz wurde eine proteinfreie Pufferprobe verwendet. Anhand der Steigung einer parallel erstellten Eichgerade erfolgte die Ermittlung der Proteinkonzentration.

#### 4.2.4.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry

Die Konzentration von Proteinen kann nach einer DOC/TCA-Fällung (Abschnitt 4.2.4.8) mithilfe der Methode nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt werden. Die in 100 µl 1 M NaOH gelösten Proteine wurden mit 900 µl Lowry-Lösung versehen, gemischt und mit 100 µl Folin-Reagenz aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 45 min im Dunkeln inkubiert und anschließend für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Proteine zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und bei 750 nm photometrisch (Specord200 Plus) bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde eine Eichgerade aus parallel behandelten BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen erstellt und die Steigung daraus ermittelt.

**Lowry-Lösung:**

5 ml l<sup>-1</sup> 2 % (v/v) K-Na-Tartrat  
 5 ml l<sup>-1</sup> 1 % (v/v) CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O  
 in 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Folin-Reagenz:**

50 % Folin-Ciocalteu-Reagenz

4.2.4.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry mit einem *Kit*

Die Konzentration der in Lösung befindlichen Proteine aus Abschnitt 4.2.4.1 wurde mithilfe des DC Protein Assay-Kit (Bio-Rad) ermittelt. Die Extinktion der Proteinproben wurde bei 750 nm an einem Spektralphotometer (UV/VIS Spektralphotometer Lambda Bio) bestimmt. Eine Kalibriergerade wurde aus parallel behandelten BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen erstellt. Anhand der Steigung konnte im Anschluss die Proteinkonzentration ermittelt werden.

## 4.2.4.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der in den Abschnitten 4.2.4.1 und 4.2.4.3 gewonnenen Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über eine 10%ige PAGE von Amreasco (NEXT Gel, 10 % Solution, Amreasco), nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden jeweils 7 µl Proteinlösung mit 5 µl Probenpuffer (NEXT GEL, Proteinladepuffer 4 x, Amreasco) und 8 µl dH<sub>2</sub>O versetzt und für 10 min bei 75 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm und RT wurden die Ansätze auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Neben den Proteinproben wurden zur besseren Zuordnung der Banden zwei unterschiedliche Größenstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, St. Leon-Rot und MagicMark™ XP Western Protein Standard) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für ca. 1 h.

## 4.2.4.13 Tricin-SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow

Zur qualitativen Analyse von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Tricin-SDS-PAGE nach Schägger & von Jagow (1987) verwendet. Proben mit löslichen Proteinen (Abschnitt 4.2.4.1) wurden mit reduzierendem Probenpuffer (5 x) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT wurden die Ansätze sowie parallel dazu ein Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, St. Leon-Rot) auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Das Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) bestand aus einer dreistufigen Polyacrylamidkonzentration mit 5 % Sammelgel, 5,9 % Spacergel und 12 % Trenngel. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei einer Spannung von 70 V, die nach ca. 30 min auf 150 V erhöht wurde. Nach erfolgter elektrophoretischer Separation wurden die Proteine entweder mittels Färbung mit Coomassie visualisiert (Abschnitt 4.2.4.14) oder für die Immunoblot-Analyse (Abschnitt 4.2.4.15) verwendet.

**Probenpuffer (5 x):**

250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
50 % (v/v)	Glycerol
10 % (w/v)	SDS
200 mM (w/v)	DTT
0,5 % (w/v)	Bromphenolblau

**Gelpuffer:**

<b>Im Trenngel:</b>	1 M Tris, pH 8,45; 0,1 % (w/v) SDS
<b>Im Spacergel:</b>	1 M Tris, pH 8,45; 0,1 % (w/v) SDS
<b>Im Sammelgel:</b>	0,75 M Tris, pH 8,45; 0,075 % (w/v) SDS

**Acrylamidmix:**

49 % (w/v)	Acrylamid / Bisacrylamid (32:1)
------------	---------------------------------

**Kathodenpuffer:**

100 mM	Tris
100 mM	Tricin
0,1 % (w/v)	SDS
pH 8,25	

**Anodenpuffer:**

100 mM	Tris, pH 8,9
--------	--------------

## 4.2.4.14 Coomassiefärbung von Proteingelen

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die PAA-Gele nach der Elektrophorese kurz in dH<sub>2</sub>O gespült und anschließend für 5 min in Fixierlösung geschwenkt. Nach der Fixierung der Proteine wurden die Gele zunächst für 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und dann zur Entfärbung abwechselnd in Fixierlösung und 7 % Essigsäure geschwenkt. Die gefärbten Proteingele wurden mithilfe eines Durchlichtscanners (Canon) digitalisiert. Für die Analyse der Proteinbanden wurde die Software *Image Lab* und *Quantity One* (beide von Bio-Rad) verwendet. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Gele unter Vakuum (bei 80 °C für 120 min) getrocknet.

**Coomassie-Färbelösung:**

50 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R250 (Roth)

**Fixierlösung:**

50 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

## 4.2.4.15 Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte mittels Immunoblot-Analyse im *Semi-Dry*-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984). Dabei wurden die mittels einer SDS-PAGE separierten Proteine (Abschnitt 4.2.4.12 und 4.2.4.13) auf eine PVDF-Membran (Roth) transferiert und anschließend mithilfe von Antikörpern markiert: Das PAA-Gel wurde nach der Elektrophorese zunächst für 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zur Vorbereitung in Methanol aktiviert, kurz

in dH<sub>2</sub>O gespült und dann für 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Anschließend wurden PAA-Gel, Membran und mit dem jeweiligen Puffer befeuchtete Blottingpapiere (Roth) entsprechend den Angaben des Herstellers auf der Apparatur platziert. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA cm<sup>-2</sup> Gel, je nach Größe des zu analysierenden Proteins, für 45 - 65 min. Nach dem Transfer wurden die immobilisierten Proteine optional durch Schwenken der Membran in Ponceau-Rot gefärbt.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen, wurde die Membran für die immunologische Detektion zunächst für 30 min in TBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tabelle 4.7; siehe auch Verdünnung der Antikörper) über Nacht bei 4 °C. Nach dem Waschen der Membran mit TBST (3 x 10 min) wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 4.7; siehe auch Verdünnung der Antikörper) für mindestens 45 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit TBST) wurden die Proteine indirekt durch die an den sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase detektiert. Dabei kam das *Immobilon Western Kit* (Merck Milipore) zur Anwendung. Die Detektion der Lichtquanten erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms, oder durch Aufnahme der Signale am *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad). Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Software *Image Lab* oder *Quantity One* (beide von Bio-Rad).

**Kathodenpuffer:**

10 % (v/v) Roti®-BlotK, 10 x Puffer (Roth)  
20 % (v/v) Methanol

**Anodenpuffer:**

10 % (v/v) Roti®-BlotA, 10 x Puffer (Roth)  
20 % (v/v) Methanol

**Ponceau-Rot:**

0,02 % (w/v) Ponceau S in 0,3 % (v/v) TCA

**TBS:**

100 mM Tris/HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl

**TBST:**

100 mM Tris/HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,1 % (v/v) Tween 20

4.2.4.16 Entfernen gebundener Antikörper (*Stripping*)

Das Entfernen gebundener Antikörper erfolgte unter Verwendung des *Thermo Restore plus western blot stripping buffer* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Die Membran konnte anschließend erneut für die immunologische Detektion spezifischer Proteine verwendet werden.

## 4.2.4.17 Messung der Sauerstoffentwicklung

Die lichtgesättigte Rate der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung wurde mit einer Clark-type Sauerstoffelektrode (Hansatech) ermittelt. Für die Messung wurde 1 ml Zellsuspension von *Synechocystis* (OD<sub>750nm</sub> = 0,8 - 1) für 2 min bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die



Sauerstoffentwicklung bei einer Belichtung mit Weißlicht (Intensität  $3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und in Gegenwart von  $10 \text{ mM NaHCO}_3$  bei  $32^\circ\text{C}$  gemessen.

Zur Bestimmung der PSII Aktivität unter lichtgesättigten Bedingungen (Weißlicht, Intensität  $3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurde ebenfalls  $1 \text{ ml}$  Zellsuspension von *Synechocystis* ( $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,8 - 1$ ) verwendet. Der Zellsuspension wurde  $1 \text{ mM DMBQ}$  (2,6-Dimethoxybenzochinon) als artifizieller Elektronenakzeptor hinzugefügt. Die Messung fand außerdem in Gegenwart von  $1 \text{ mM FeCy}$  (Kaliumferricyanid) statt, welches DMBQ in oxidierte Form stabilisiert.

Für die Bestimmung beider Raten wurden jeweils von drei unabhängigen Kulturen drei Messungen durchgeführt und anschließend gemittelt.

#### 4.2.4.18 77 K-Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Die 77 K-Fluoreszenzemissionsspektroskopie wurde zur Bestimmung des relativen Verhältnisses von PSI zu PSII sowie zu den Phycobilisomen verwendet. Dazu wurde eine Zellsuspension von *Synechocystis* auf  $35 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  konzentriert, in  $50 \mu\text{l}$  Aliquote aufgeteilt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Fluoreszenz wurde bei  $77 \text{ K (Kelvin)}$  unter Anregung mit orangefarbenem Licht (bei  $580 \text{ nm}$ ) oder blauem Licht bei ( $440 \text{ nm}$ ) an einem Spektrometer (Ocean Optics) gemessen. Die Emissionsspektren wurden aus mindestens drei unabhängigen Kulturen gemittelt, mit einem gleitenden Median geglättet, um die Grundfluoreszenz reduziert und auf den höchsten Wert des PSI bei  $721 \text{ nm}$  normiert. Dieser Wert wurde auf 1 gesetzt.

#### 4.2.4.19 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen von *Synechocystis*-Zellen wurden mit einem Delta Vision Spectris Optical Sectioning (OSM) Fluoreszenzmikroskop bei RT in Zusammenarbeit mit Frau Ilka M. Axmann (Charité Berlin) und Herrn Thomas Zielke (Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde ein definiertes Volumen an *Synechocystis*-Zellen zunächst Objektträgern aufgetragen, die zuvor mit Agar präpariert wurden. Zum Anfärben der DNA wurde der Hoechst-Farbstoff 33258 verwendet. Die Anregung erfolgte mit UV-Licht bei  $\sim 360 \text{ nm}$ , während die Emission des Farbstoffs bei  $457 \text{ nm}$  gemessen wurde. Um die Thylakoidmembranen sichtbar zu machen, wurde die Emission der Autofluoreszenz von Chlorophyll *a* bei einer Wellenlänge von  $617 \text{ nm}$  aufgezeichnet. Dafür wurden die Zellen bei  $\sim 435 \text{ nm}$  angeregt und mit einem  $100\times$  Objektiv aufgenommen.

## Literaturverzeichnis

- Allen, M. M., & Smith, A. J.** (1969) Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Microbiol*, 69(2), 114-120.
- Ando, Y., Asari, S., Suzuma, S., Yamane, K., & Nakamura, K.** (2002) Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the *yocI-yocJ* intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. *FEMS Microbiol Lett*, 207(1), 29-33.
- Antal, T., Kurkela, J., Parikainen, M., Kårlund, A., Hakkila, K., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2016) Roles of group 2 sigma factors in acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to nitrogen deficiency. *Plant Cell Physiol*, 57(6), 1309-1318.
- Asayama, M., Imamura, S., Yoshihara, S., Miyazaki, A., Yoshida, N., Sazuka, T., Kaneko, T., Ohara, O., Tabata, S., & Osanai, T.** (2004) SigC, the group 2 sigma factor of RNA polymerase, contributes to the late-stage gene expression and nitrogen promoter recognition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 68(3), 477-487.
- Axmann, I. M., Holtzendorff, J., Voß, B., Kensche, P., & Hess, W. R.** (2007) Two distinct types of 6S RNA in *Prochlorococcus*. *Gene*, 406(1-2), 69-78.
- Axmann, I. M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H., & Hess, W. R.** (2005) Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biol*, 6(9), R73.
- Babitzke, P., & Romeo, T.** (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol*, 10(2), 156-163.
- Babu, M. M., Luscombe, N. M., Aravind, L., Gerstein, M., & Teichmann, S. A.** (2004) Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol*, 14(3), 283-291.
- Baier, A., Winkler, W., Korte, T., Lockau, W., & Karradt, A.** (2014) Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803: evidence for essential formation of an NblA1/NblA2 heterodimer and its codegradation by a Clp protease complex. *J Biol Chem*, 289(17), 11755-11766.
- Bailey, T. L., & Elkan, C.** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2, 28-36.
- Ball, S. G., & Morell, M. K.** (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 207-233.
- Barrick, J. E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L., & Breaker, R. R.** (2005) 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA*, 11(5), 774-784.
- Beck, C., Hertel, S., Rediger, A., Lehmann, R., Wiegard, A., Kolsch, A., Heilmann, B., Georg, J., Hess, W. R., & Axmann, I. M.** (2014) Daily expression pattern of protein-encoding genes and small noncoding RNAs in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol*, 80(17), 5195-5206.
- Beckmann, B. M., Burenina, O. Y., Hoch, P. G., Kubareva, E. A., Sharma, C. M., & Hartmann, R. K.** (2011) In vivo and in vitro analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol*, 8(5), 839-849.
- Beckmann, B. M., Grünweller, A., Weber, M. H. W., & Hartmann, R. K.** (2010) Northern blot detection of endogenous small RNAs (~14 nt) in bacterial total RNA extracts. *Nucleic Acids Res*, 38(14), e147.

- Beckmann, B. M., Hoch, P. G., Marz, M., Willkomm, D. K., Salas, M., & Hartmann, R. K. (2012) A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*, 31(7), 1727-1738.
- Beisel, C. L., & Storz, G. (2010) Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev*, 34(5), 866-882.
- Bensadoun, A., & Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, 70(1), 241-250.
- Berghoff, B., & Klug, G. (2012) Small RNAs with a role in the oxidative stress response of bacteria. In Hess, R. W. & Marchfelder, A. (Eds.), *Regulatory RNAs in Prokaryotes* (pp. 1-14). Vienna; Springer
- Bernecky, C., & Cramer, P. (2013) Struggling to let go: a non-coding RNA directs its own extension and destruction. *EMBO J*, 32(6), 771-772.
- Bhaya, D., Watanabe, N., Ogawa, T., & Grossman, A. R. (1999) The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3188-3193.
- Billis, K., Billini, M., Tripp, H., Kyrpides, N. C., & Mavrommatis, K. (2014) Comparative transcriptomics between *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 provide insights into mechanisms of stress acclimation. 9(10), e109738.
- Bøggild, A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P., & Brodersen, D. E. (2009) Cyanobacteria contain a structural homologue of the Hfq protein with altered RNA-binding properties. *The FEBS Journal*, 276(14), 3904-3915.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248-254.
- Brantl, S. (2008) *Cis und trans*: Genregulation in Bakterien. *Biospektrum*, 14, 690-694.
- Breaker, R. R. (2012) Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2), a003566.
- Brownlee, G. G. (1971) Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nat New Biol*, 229(5), 147-149.
- Burenina, O. Y., Elkina, D. A., Hartmann, R. K., Oretskaya, T. S., & Kubareva, E. A. (2015) Small noncoding 6S RNAs of bacteria. *Biochemistry (Mosc)*, 80(11), 1429-1446.
- Cavanagh, A. T., Chandrangu, P., & Wassarman, K. M. (2010) 6S RNA regulation of *relA* alters ppGpp levels in early stationary phase. *Microbiology*, 156(12), 3791-3800.
- Cavanagh, A. T., Klocko, A. D., Liu, X., & Wassarman, K. M. (2008) Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of  $\sigma^{70}$ . *Mol Microbiol*, 67(6), 1242-1256.
- Cavanagh, A. T., Sperger, J., & Wassarman, K. (2012) Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 40(5), 2234-2246.
- Cavanagh, A. T., & Wassarman, K. M. (2014) 6S RNA, a global regulator of transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and beyond. *Annu Rev Microbiol*, 68(1), 45-60.
- Cerveny, J., Sinetova, M. A., Zavrel, T., & Los, D. A. (2015) Mechanisms of high temperature resistance of *Synechocystis* sp. PCC 6803: An impact of histidine kinase 34. *Life (Basel)*, 5(1), 676-699.
- Chae, H., Han, K., Kim, K., Park, H., Lee, J., & Lee, Y. (2011) Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of

- downstream *ygfa* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase). *J Biol Chem*, 286(1), 114-122.
- Collier, J. L., & Grossman, A. R.** (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol*, 174(14), 4718-4726.
- Collier, J. L., & Grossman, A. R.** (1994) A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J*, 13(5), 1039-1047.
- Cyanobase.** 6S RNA-kodierendes Gen *ssaA* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis/genes/ssaA>
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., & Wagner, E. G. H.** (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol Cell*, 26(3), 381-392.
- de Porcellinis, A. J., Klahn, S., Rosgaard, L., Kirsch, R., Gutekunst, K., Georg, J., Hess, W. R., & Sakuragi, Y.** (2016) The non-coding RNA ncr0700/PmgR1 is required for photomixotrophic growth and the regulation of glycogen accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*, 57(10), 2091-2103.
- Dexter, J., Armshaw, P., Sheahan, C., & Pembroke, J. T.** (2015) The state of autotrophic ethanol production in Cyanobacteria. *J Appl Microbiol*, 119(1), 11-24.
- Dienst, D., Duhring, U., Mollenkopf, H. J., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W. R., & Wilde, A.** (2008) The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 154(10), 3134-3143.
- Ding, Y., Xu, L., Jovanovic, B. D., Helenowski, I. B., Kelly, D. L., Catalona, W. J., Yang, X. J., Pins, M., & Bergan, R. C.** (2007) The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *J Biomol Tech*, 18(5), 321-330.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E.** (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Douglas, S. E.** (2004) Chloroplast origins and evolution. In Bryant, D. A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 91-118). New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow; Kluwer Academic Publishers.
- Ducat, D. C., Way, J. C., & Silver, P. A.** (2011) Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*, 29(2), 95-103.
- Dühning, U., Axmann, I. M., Hess, W. R., & Wilde, A.** (2006) An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(18), 7054-7058.
- Elkina, D., Weber, L., Lechner, M., Burenina, O., Weisert, A., Kubareva, E., Hartmann, R. K., & Klug, G.** (2017) 6S RNA in *Rhodobacter sphaeroides*: 6S RNA and pRNA transcript levels peak in late exponential phase and gene deletion causes a high salt stress phenotype. *RNA Biol*, 14(11), 1627-1637.
- Ermakova, S. Y., Elanskaya, I. V., Kallies, K. U., Weihe, A., Börner, T., & Shestakov, S. V.** (1993) Cloning and sequencing of mutant *psbB* genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth Res.*, 37(2), 139-146.
- Evguenieva-Hackenberg, E., & Klug, G.** (2011) New aspects of RNA processing in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 14(5), 587-592.
- Fadoulglou, V. E., Lin, H. T. V., Tria, G., Hernández, H., Robinson, C. V., Svergun, D. I., & Luisi, B. F.** (2015) Maturation of 6S regulatory RNA to a highly elongated structure. *FEBS J*, 282(23), 4548-4564.

- Farrance, I.** (1987) Plasma glucose methods, a review. *Clin Biochem Reviews*, 8, 55-68.
- Faucher, S. P., Friedlander, G., Livny, J., Margalit, H., & Shuman, H. A.** (2010) *Legionella pneumophila* 6S RNA optimizes intracellular multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(16), 7533-7538.
- Fu, J., & Xu, X.** (2006) The functional divergence of two *glgP* homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 260(2), 201-209.
- Fuchs, G.** (2007) Oxygene phototrophe Bakterien (Cyanobakterien) *Allgemeine Mikrobiologie* (pp. 409-413). Stuttgart, New York; Georg Thieme Verlag.
- García-Domínguez, M., Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J.** (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J Bacteriol*, 182(1), 38-44.
- Georg, J., Dienst, D., Schurgers, N., Wallner, T., Kopp, D., Stazic, D., Kuchmina, E., Klahn, S., Lokstein, H., Hess, W. R., & Wilde, A.** (2014) The small regulatory RNA SyR1/PsrR1 controls photosynthetic functions in cyanobacteria. *Plant Cell*, 26(9), 3661-3679.
- Georg, J., & Hess, W. R.** (2011) Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(2), 286-300.
- Georg, J., & Hess, W. R.** (2012) Natural antisense transcripts in bacteria. In Hess, R. W. & Marchfelder, A. (Eds.), *Regulatory RNAs in Prokaryotes* (pp. 95-108). Vienna; Springer
- Georg, J., Voss, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A., & Hess, W. R.** (2009) Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol*, 5, 305.
- Gerdes, S. Y., Kurnasov, O. V., Shatalin, K., Polanuyer, B., Sloutsky, R., Vonstein, V., Overbeek, R., & Osterman, A. L.** (2006) Comparative genomics of NAD biosynthesis in cyanobacteria. *J Bacteriol*, 188(8), 3012-3023.
- Giangrossi, M., Prosseda, G., Tran, C. N., Brandi, A., Colonna, B., & Falconi, M.** (2010) A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res*, 38(10), 3362-3375.
- Gildehaus, N., Neußer, T., Wurm, R., & Wagner, R.** (2007) Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Res*, 35(6), 1885-1896.
- Giner-Lamia, J., Robles-Rengel, R., Hernandez-Prieto, M. A., Muro-Pastor, M. I., Florencio, F. J., & Futschik, M. E.** (2017) Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Nucleic Acids Res*, 45(20), 11800-11820.
- Goldstein, J., & Harewood, K.** (1969) Another species of ribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 39(2), 383-387.
- Görl, M., Sauer, J., Baier, T., & Forchhammer, K.** (1998) Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology*, 144(Pt 9), 2449-2458.
- Gottesman, S., & Storz, G.** (2011) Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12), a003798.
- Grigorieva, G., & Shestakov, S.** (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett*, 13(4), 367-370.
- Grigorova, I. L., Phleger, N. J., Mutalik, V. K., & Gross, C. A.** (2006) Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14), 5332-5337.

- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G., & Collier, J. L.** (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev*, 57(3), 725-749.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G., & Collier, J. L.** (2004) The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In Bryant, D. A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Vol. 1, pp. 641-675). New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow; Kluwer Academic Publishers.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A.** (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*, 57, 441-466.
- Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., & Zilliges, Y.** (2012) Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 158(Pt 12), 3032-3043.
- Gunnelius, L., Hakkila, K., Kurkela, J., Wada, H., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2014) The omega subunit of the RNA polymerase core directs transcription efficiency in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res*, 42(7), 4606-4614.
- Gunnelius, L., Tuominen, I., Rantamäki, S., Pollari, M., Ruotsalainen, V., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2010) SigC sigma factor is involved in acclimation to low inorganic carbon at high temperature in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 156(Pt 1), 220-229.
- Haase, J., Lurz, R., Grahn, A. M., Bamford, D. H., & Lanka, E.** (1995) Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J Bacteriol*, 177(16), 4779-4791.
- Hagemann, M., Fulda, S., & Schubert, H.** (1994) DNA, RNA and protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 adapted to different salt concentrations. *Current Microbiology*, 28(4), 201-207.
- Hakkila, K., Antal, T., Rehman, A. U., Kurkela, J., Wada, H., Vass, I., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2014) Oxidative stress and photoinhibition can be separated in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta*, 1837(2), 217-225.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Hauf, W., Schlebusch, M., Hüge, J., Kopka, J., Hagemann, M., & Forchhammer, K.** (2013) Metabolic changes in *Synechocystis* PCC6803 upon nitrogen-starvation: Excess NADPH sustains polyhydroxybutyrate accumulation. *Metabolites*, 3(1), 101-118.
- Heilmann, B., Hakkila, K., Georg, J., Tyystjärvi, T., Hess, W. R., Axmann, I. M., & Dienst, D.** (2017) 6S RNA plays a role in recovery from nitrogen depletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Microbiol*, 17(1), 229.
- Helmann, J. D., & Chamberlin, M. J.** (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem*, 57(1), 839-872.
- Herdman, M., Castenholz, R. W., Iteman, I., & Rippka, R.** (2015) Form- *Synechocystis*. In Whitman, W. B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B. & Dedysh, S. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E.** (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol*, 183(2), 411-425.
- Hess, W. R., Berghoff, B. A., Wilde, A., Steglich, C., & Klug, G.** (2014) Riboregulators and the role of Hfq in photosynthetic bacteria. *RNA Biol*, 11(5), 413-426.

- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., & Ikeuchi, M. (2001) DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell*, 13(4), 793-806.
- Hihara, Y., Sonoike, K., Kanehisa, M., & Ikeuchi, M. (2003) DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 185(5), 1719-1725.
- Hindley, J. (1967) Fractionation of 32-P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamid gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol*, 30(1), 125-136.
- Hoch, P. G., Schlereth, J., Lechner, M., & Hartmann, R. K. (2016) *Bacillus subtilis* 6S-2 RNA serves as a template for short transcripts in vivo. *RNA*, 22(4), 614-622.
- Hofmann, N., Wurm, R., & Wagner, R. (2011) The *E. coli* anti-sigma factor Rsd: Studies on the specificity and regulation of its expression. *PLoS One*, 6(5), e19235.
- Hsu, L. M., Zagorski, J., Wang, Z., & Fournier, M. J. (1985) *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. *J Bacteriol*, 161(3), 1162-1170.
- Huckauf, J., Nomura, C., Forchhammer, K., & Hagemann, M. (2000) Stress responses of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 mutants impaired in genes encoding putative alternative sigma factors. *Microbiology*, 146(11), 2877-2889.
- Hughes, K. T., & Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, 52, 231-286.
- Imamura, S., & Asayama, M. (2009) Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regul Syst Biol*, 3, 65-87.
- Imamura, S., Asayama, M., Takahashi, H., Tanaka, K., Takahashi, H., & Shirai, M. (2003a) Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria. *FEBS Lett*, 554(3), 357-362.
- Imamura, S., Tanaka, K., Shirai, M., & Asayama, M. (2006) Growth phase-dependent activation of nitrogen-related genes by a control network of group 1 and group 2 sigma factors in a cyanobacterium. *J Biol Chem*, 281, 2668-2675.
- Imamura, S., Yoshihara, S., Nakano, S., Shiozaki, N., Yamada, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Asayama, M., & Shirai, M. (2003b) Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium. *J Mol Biol*, 325(5), 857-872.
- Inoue, N., Taira, Y., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., & Satoh, K. (2001) Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on Photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol*, 42(10), 1140-1148.
- Jeanguenin, L., Lara-Núñez, A., Pribat, A., Mageroy, M. H., Gregory, J. F., Rice, K. C., de Crécy-Lagard, V., & Hanson, A. D. (2010) Moonlighting glutamate formiminotransferases can functionally replace 5-formyltetrahydrofolate cycloligase. *J Biol Chem*, 285(53), 41557-41566.
- Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., & Ishihama, A. (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol*, 178(18), 5447-5451.
- Kaczmarzyk, D., Anfelt, J., Sarnegrim, A., & Hudson, E. P. (2014) Overexpression of sigma factor SigB improves temperature and butanol tolerance of *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Biotechnol*, 182-183, 54-60.

- Kakoschke, T., Kakoschke, S., Magistro, G., Schubert, S., Borath, M., Heesemann, J., & Rossier, O. (2014) The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in *Yersinia enterocolitica*. *PLoS One*, 9(1), e86113.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., & Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res*, 3(3), 109-136.
- Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M., Suzuki, I., Hayashi, H., & Murata, N. (2007) Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J*, 49(2), 313-324.
- Kazantsev, A. V., & Pace, N. R. (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Micro*, 4(10), 729-740.
- Keppeler, D., & Decker, K. (1974) Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 1127-1131). New York; Academic Press.
- Khan, R. I., Wang, Y., Afrin, S., Wang, B., Liu, Y., Zhang, X., Chen, L., Zhang, W., He, L., & Ma, G. (2016) Transcriptional regulator PrqR plays a negative role in glucose metabolism and oxidative stress acclimation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci Rep*, 6, 32507.
- Kim, E. Y., Shin, M. S., Rhee, J. H., & Choy, H. E. (2004) Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol*, 42(2), 103-110.
- Kim, J. H., & Suh, K. H. (2005) Light-dependent expression of superoxide dismutase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch Microbiol*, 183(3), 218-223.
- Kim, K. S., & Lee, Y. (2004) Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. *Nucleic Acids Res*, 32(20), 6057-6068.
- Klähn, S., Schaal, C., Georg, J., Baumgartner, D., Knippen, G., Hagemann, M., Muro-Pastor, A. M., & Hess, W. R. (2015) The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(45), 6243-6252.
- Klemke, F., Nürnberg, D. J., Ziegler, K., Beyer, G., Kahmann, U., Lockau, W., & Volkmer, T. (2016) CphA2 is a novel type of cyanophycin synthetase in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Microbiology*, 162(3), 526-536.
- Klocko, A. D., & Wassarman, K. M. (2009) 6S RNA binding to Eo<sup>70</sup> requires a positively charged surface of  $\sigma^{70}$  region 4.2. *Mol Microbiol*, 73(2), 152-164.
- Klotz, A., Georg, J., Bucinska, L., Watanabe, S., Reimann, V., Januszewski, W., Sobotka, R., Jendrossek, D., Hess, W. R., & Forchhammer, K. (2016) Awakening of a dormant cyanobacterium from nitrogen chlorosis reveals a genetically determined program. *Curr Biol*, 26(21), 2862-2872.
- Kondo, J., Dock-Bregeon, A. C., Willkomm, D. K., Hartmann, R. K., & Westhof, E. (2013) Structure of an A-form RNA duplex obtained by degradation of 6S RNA in a crystallization droplet. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69(Pt 6), 634-639.



- Kopf, M., & Hess, W. R. (2015) Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 39(3), 301-315.
- Kopf, M., Klahn, S., Scholz, I., Matthiessen, J. K., Hess, W. R., & Voss, B. (2014) Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res*, 21(5), 527-539.
- Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol*, 10(4), 255-265.
- Koskinen, S., Hakkila, K., Gunnelius, L., Kurkela, J., Wada, H., & Tyystjärvi, T. (2016) In vivo recruitment analysis and a mutant strain without any group 2  $\sigma$  factor reveal roles of different  $\sigma$  factors in cyanobacteria. *Mol Microbiol*, 99(1), 43-54.
- Krasikov, V., Aguirre von Wobeser, E., Dekker, H. L., Huisman, J., & Matthijs, H. C. (2012) Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiol Plant*, 145(3), 426-439.
- Krinke, L., Mahoney, M., & Wulff, D. L. (1991) The role of the OOP antisense RNA in coliphage  $\lambda$  development. *Mol Microbiol*, 5(5), 1265-1272.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10(3-4), 203-209.
- Lalaouna, D., Simoneau-Roy, M., Lafontaine, D., & Masse, E. (2013) Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1829(6-7), 742-747.
- Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. (2009) Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 33(2), 258-278.
- Lee, C. A., Fournier, M. J., & Beckwith, J. (1985) *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. *J Bacteriol*, 161(3), 1156-1161.
- Lee, J. Y., Park, H., Bak, G., Kim, K. S., & Lee, Y. (2013) Regulation of transcription from two *ssrS* promoters in 6S RNA biogenesis. *Mol Cells*, 36(3), 227-234.
- Lee, S. Y., Bailey, S. C., & Apirion, D. (1978) Small stable RNAs from *Escherichia coli*: Evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA. *J Bacteriol*, 133(2), 1015-1023.
- Leek, J. T., Scharpf, R. B., Bravo, H. C., Simcha, D., Langmead, B., Johnson, W. E., Geman, D., Baggerly, K., & Irizarry, R. A. (2010) Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet*, 11(10), 733-739.
- Legewie, S., Dienst, D., Wilde, A., Herzel, H., & Axmann, I. M. (2008) Small RNAs establish delays and temporal thresholds in gene expression. *Biophys J*, 95(7), 3232-3238.
- Li, H., & Sherman, L. A. (2002) Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and  $\Delta nbl$  mutants under nitrogen-deficient conditions. *Arch Microbiol*, 178(4), 256-266.
- Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M., & Sherman, L. A. (2004) Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 186(11), 3331-3345.
- Liu, X. G., Zhao, J. J., & Wu, Q. Y. (2005) Oxidative stress and metal ions effects on the cores of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*, 579(21), 4571-4576.
- Los, D. A., Zorina, A., Sinetova, M., Kryazhov, S., Mironov, K., & Zinchenko, V. V. (2010) Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors (Basel)*, 10(3), 2386-2415.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Ma, F., Zhang, X., Zhu, X., Li, T., Zhan, J., Chen, H., He, C., & Wang, Q.** (2017) Dynamic changes of IsiA-containing complexes during long-term iron deficiency in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Plant*, 10(1), 143-154.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. M.** (2006a) Eukaryoten und Organellen: Endosymbiose *Brock Mikrobiologie* (Vol. 11, pp. 343-345). München Pearson Studium.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. M.** (2006b) Phylum 4: Cyanobakterien und Prochlorophyta *Brock Mikrobiologie* (Vol. 11, pp. 444-445). München; Pearson Studium.
- Maeda, H., Fujita, N., & Ishihama, A.** (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 28(18), 3497-3503.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V.** (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Micro*, 9(6), 467-477.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann, M., & Murata, N.** (2003) Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15), 9061-9066.
- Marraffini, L. A.** (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55-61.
- Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C. M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voss, B., Steglich, C., Wilde, A., Vogel, J., & Hess, W. R.** (2011a) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(5), 2124-2129.
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W. R., & Muro-Pastor, A. M.** (2011b) Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(50), 20130-20135.
- Morfeldt, E., Taylor, D., von Gabain, A., & Arvidson, S.** (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J*, 14(18), 4569-4577.
- Mullineaux, C. W., & Allen, J. F.** (1990) State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystems I and II. *Photosynth Res*, 23(3), 297-311.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(Pt 1), 263-273.
- Muro-Pastor, A. M., Herrero, A., & Flores, E.** (2001) Nitrogen-regulated group 2 sigma factor from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen stress. *J Bacteriol*, 183(3), 1090-1095.
- Myers, J., Graham, J. R., & Wang, R. T.** (1980) Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol*, 66(6), 1144-1149.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Hirose, M., Miyajima, N., & Tabata, S.** (1998) CyanoBase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucleic Acids Res*, 26(1), 63-67.
- NCBI.** *Synechocystis* sp. PCC 6803 substr. PCC-N.  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13549?genome\\_assembly\\_id=174976](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13549?genome_assembly_id=174976)

- Neusser, T., Polen, T., Geissen, R., & Wagner, R. (2010) Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery. *BMC Genomics*, 11, 165.
- Nikkinen, H. L., Hakkila, K., Gunnelius, L., Huokko, T., Pollari, M., & Tyystjärvi, T. (2012) The SigB  $\sigma$  factor regulates multiple salt acclimation responses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 158(1), 514-523.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., Yamamoto, H., Hayashi, H., & Murata, N. (2004) Singlet oxygen inhibits the repair of Photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, 43(35), 11321-11330.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A., & Murata, N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J*, 20(20), 5587-5594.
- Opdyke, J. A., Kang, J. G., & Storz, G. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(20), 6698-6705.
- Ortega, A. D., Gonzalo-Asensio, J., & Garcia-del Portillo, F. (2012) Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells. *RNA Biol*, 9(4), 469-488.
- Osanai, T., Ikeuchi, M., & Tanaka, K. (2008) Group 2 sigma factors in cyanobacteria. *Physiol Plant*, 133(3), 490-506.
- Osanai, T., Imamura, S., Asayama, M., Shirai, M., Suzuki, I., Murata, N., & Tanaka, K. (2006) Nitrogen induction of sugar catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res*, 13(5), 185-195.
- Osanai, T., Imashimizu, M., Seki, A., Sato, S., Tabata, S., Imamura, S., Asayama, M., Ikeuchi, M., & Tanaka, K. (2009) ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(16), 6860-6865.
- Osanai, T., Kanesaki, Y., Nakano, T., Takahashi, H., Asayama, M., Shirai, M., Kanehisa, M., Suzuki, I., Murata, N., & Tanaka, K. (2005) Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2  $\sigma$  factor SigE. *J Biol Chem*, 280(35), 30653-30659.
- Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M. A., Kanesaki, Y., Satoh, S., Tabata, S., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Hayashi, H., Tanticharoen, M., Suzuki, I., & Murata, N. (2004) Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J Biol Chem*, 279(51), 53078-53086.
- Panchapakesan, S. S., & Unrau, P. J. (2012) *E. coli* 6S RNA release from RNA polymerase requires  $\sigma^{70}$  ejection by scrunching and is orchestrated by a conserved RNA hairpin. *RNA*, 18(12), 2251-2259.
- Panda, B., Jain, P., Sharma, L., & Mallick, N. (2006) Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresour Technol*, 97(11), 1296-1301.
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J. C., & Vogel, J. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), 840-846.
- Piper, S. E., Mitchell, J. E., Lee, D. J., & Busby, S. J. (2009) A global view of *Escherichia coli* Rsd protein and its interactions. *Mol Biosyst*, 5(12), 1943-1947.
- Pollari, M., Gunnelius, L., Tuominen, I., Ruotsalainen, V., Tyystjärvi, E., Salminen, T., & Tyystjärvi, T. (2008) Characterization of single and double inactivation strains reveals new physiological roles

- for group 2  $\sigma$  factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*, 147(4), 1994-2005.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M.** (2015) The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Rediger, A., Geissen, R., Steuten, B., Heilmann, B., Wagner, R., & Axmann, I. M.** (2012) 6S RNA - an old issue became blue-green. *Microbiology*, 158(10), 2480-2491.
- Ren, J., Sang, Y., Qin, R., Cui, Z., & Yao, Y. F.** (2017) 6S RNA is involved in acid resistance and invasion of epithelial cells in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Future Microbiol*, 12(12), 1045-1057.
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., & Thomas, J. C.** (2001) Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 183(10), 2989-2994.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y.** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 111, 1-61.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K.** (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 43(7), e47.
- Rozen, S., & Skaletsky, H.** (1999) Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In Misener, S. & Krawetz, S. A. (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (pp. 365-386). Totowa, NJ; Humana Press.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B.** (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944-945.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., & Quackenbush, J.** (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2), 374-378.
- Sambrook, J., & Russell, D. W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 3). USA; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Sauer, E.** (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol*, 10(4), 610-618.
- Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Völker, U., & Forchhammer, K.** (2001) Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiol*, 126(1), 233-243.
- Schägger, H., & von Jagow, G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2), 368-379.
- Scherer, A.** (2009) Variation, Variability, Batches and Bias in Microarray Experiments: An Introduction. In Scherer, A. (Ed.), *Batch Effects and Noise in Microarray Experiments: Sources and Solutions* (pp. 1-4); John Wiley & Sons, Ltd.

- Schopf, J. W., & Walter, M. R.** (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. In Carr, N. (Ed.), *The Biology of Cyanobacteria* (Vol. 19, pp. 543-564). Boston; Blackwell Scientific Publications.
- Schuergers, N., Ruppert, U., Watanabe, S., Nurnberg, D. J., Lochnit, G., Dienst, D., Mullineaux, C. W., & Wilde, A.** (2014) Binding of the RNA chaperone Hfq to the type IV pilus base is crucial for its function in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol*, 92(4), 840-852.
- Schwarz, R., & Forchhammer, K.** (2005) Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology*, 151(Pt 8), 2503-2514.
- Schwarz, R., Lieman-Hurwitz, J., Hassidim, M., & Kaplan, A.** (1992) Phenotypic complementation of high CO<sub>2</sub>-requiring mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 by inosine 5'-monophosphate. *Plant Physiol*, 100(4), 1987-1993.
- Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H., & Vogel, J.** (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev*, 21(21), 2804-2817.
- Sharma, C. M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermuller, J., Reinhardt, R., Stadler, P. F., & Vogel, J.** (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464(7286), 250-255.
- Sharma, U. K., & Chatterji, D.** (2010) Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev*, 34(5), 646-657.
- Shephard, L., Dobson, N., & Unrau, P. J.** (2010) Binding and release of the 6S transcriptional control RNA. *RNA*, 16(5), 885-892.
- Sidler, W. A.** (2004) Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In Bryant, D. A. (Ed.), *The Molecular biology of cyanobacteria*. (pp. 139–216). New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow; Kluwer Academic Publishers.
- Singh, A. K., Summerfield, T. C., Li, H., & Sherman, L. A.** (2006) The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB. *Arch Microbiol*, 186(4), 273-286.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., & Vogel, J.** (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 63(1), 193-217.
- Sonnleitner, E., Sorger-Domenigg, T., & Bläsi, U.** (2012) *Pseudomonas aeruginosa* small regulatory RNAs. In Hess, W. R. & Marchfelder, A. (Eds.), *Regulatory RNAs in Prokaryotes* (pp. 77-94). Vienna; Springer
- Spät, P., Klotz, A., Rexroth, S., Macek, B., & Forchhammer, K.** (2018) Chlorosis as a developmental program in cyanobacteria: the proteomic fundament for survival and awakening. *Mol Cell Proteomics*, 17(9), 1650-1669.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G.** (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev*, 35(2), 171-205.
- Stazic, D., Lindell, D., & Steglich, C.** (2011) Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA–RNA duplex formation during phage infection. *Nucleic Acids Res*, 39(11), 4890-4899.
- Steuten, B., Hoch, P. G., Damm, K., Schneider, S., Köhler, K., Wagner, R., & Hartmann, R. K.** (2014a) Regulation of transcription by 6S RNAs: Insights from the *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* model systems. *RNA Biol*, 11(5), 508-521.

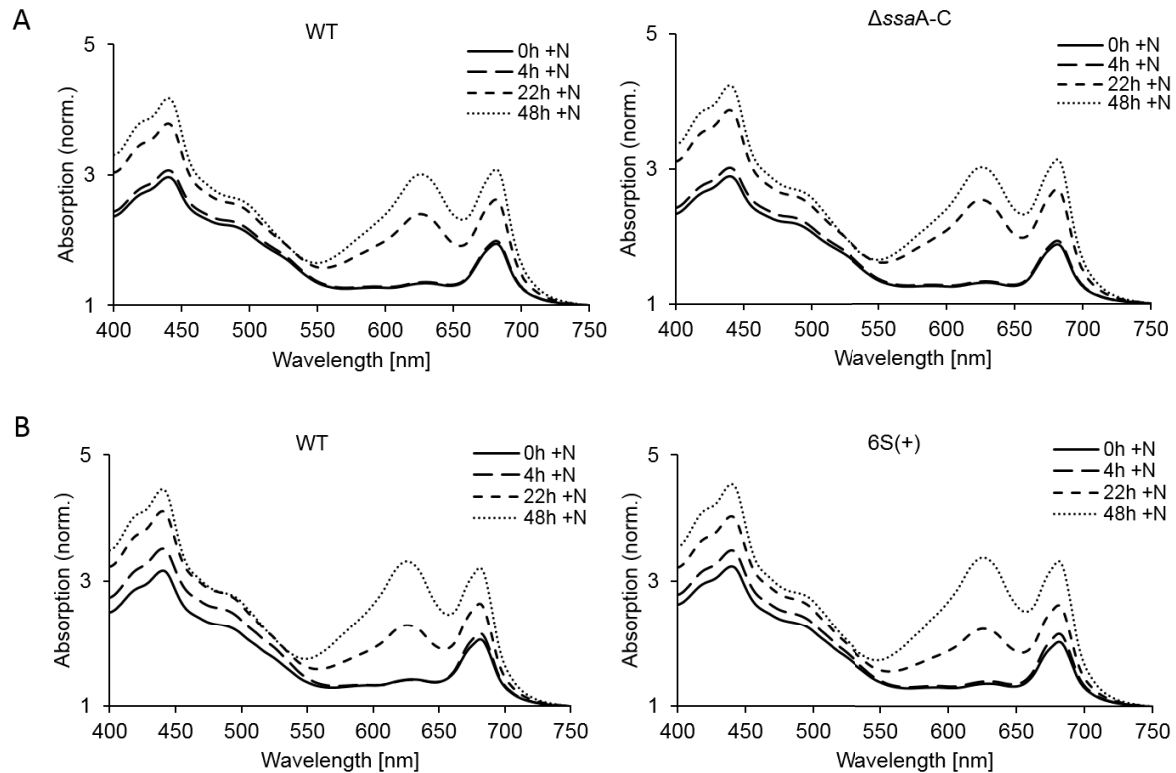
- Steuten, B., Schneider, S., & Wagner, R.** (2014b) 6S RNA: recent answers - future questions. *Mol Microbiol*, 91(4), 641-648.
- Steuten, B., Setny, P., Zacharias, M., & Wagner, R.** (2013) Mapping the spatial neighborhood of the regulatory 6S RNA bound to *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme. *J Mol Biol*, 425(19), 3649-3661.
- Steuten, B., & Wagner, R.** (2012) A conformational switch is responsible for the reversal of the 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in *Escherichia coli*. *Biol Chem*, 393(12), 1513-1522.
- Stewart, P. S., Wattanakaroon, W., Goodrum, L., Fortun, S. M., & McLeod, B. R.** (1999) Electrolytic generation of oxygen partially explains electrical enhancement of tobramycin efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(2), 292-296.
- Stohl, E. A., Lenz, J. D., Dillard, J. P., & Seifert, H. S.** (2016) The gonococcal NlpD protein facilitates cell separation by activating peptidoglycan cleavage by AmiC. *J Bacteriol*, 198(4), 615-622.
- Summerfield, T. C., & Sherman, L. A.** (2007) Role of sigma factors in controlling global gene expression in light/dark transitions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 189(21), 7829-7840.
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R., & Murata, N.** (2005) The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol*, 138(3), 1409-1421.
- Suzuma, S., Asari, S., Bunai, K., Yoshino, K., Ando, Y., Kakeshita, H., Fujita, M., Nakamura, K., & Yamane, K.** (2002) Identification and characterization of novel small RNAs in the *aspS-yrvM* intergenic region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology*, 148(Pt 8), 2591-2598.
- Tahara, H., Uchiyama, J., Yoshihara, T., Matsumoto, K., & Ohta, H.** (2012) Role of Slr1045 in environmental stress tolerance and lipid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim Biophys Acta*, 1817(8), 1360-1366.
- Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J.** (1988) Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. *Methods Enzymol*, 167, 318-328.
- Thor, J. J., Mullineaux, C. W., Matthijs, H. C. P., & Hellingwerf, K. J.** (1998) Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. *Botanica Acta*, 111(6), 430-443.
- Trautmann, D., Voss, B., Wilde, A., Al-Babili, S., & Hess, W. R.** (2012) Microevolution in cyanobacteria: Re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res*, 19(6), 435-448.
- Travers, A. A., & Burgess, R. R.** (1969) Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature*, 222(5193), 537-540.
- Trotochaud, A. E., & Wassarman, K. M.** (2004) 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol*, 186(15), 4978-4985.
- Trotochaud, A. E., & Wassarman, K. M.** (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol*, 12(4), 313-319.
- Trotochaud, A. E., & Wassarman, K. M.** (2006) 6S RNA regulation of *pspF* transcription leads to altered cell survival at high pH. *J Bacteriol*, 188(11), 3936-3943.
- Tuominen, I., Pollari, M., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2006) The SigB  $\sigma$  factor mediates high-temperature responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett*, 580(1), 319-323.

- Tuominen, I., Pollari, M., von Wobeser, E. A., Tyystjärvi, E., Ibelings, B. W., Matthijs, H. C. P., & Tyystjärvi, T.** (2008) Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett*, 582(2), 346-350.
- Tuominen, I., Tyystjärvi, E., & Tyystjärvi, T.** (2003) Expression of primary sigma factor (PSF) and PSF-like sigma factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 185(3), 1116-1119.
- Urban, J. H., & Vogel, J.** (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLOS Biol*, 6(3), e64.
- Vogel, D. W., Hartmann, R. K., Struck, J. C., Ulbrich, N., & Erdmann, V. A.** (1987) The sequence of the 6S RNA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res*, 15(11), 4583-4591.
- Vogel, J., & Luisi, B. F.** (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 9(8), 578-589.
- Wagner, E. G. H.** (2013) Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol*, 10(4), 619-626.
- Wagner, E. G. H., & Romby, P.** (2015) Chapter Three - Small RNAs in bacteria and archaea: Who they are, what they do, and how they do it. In Friedmann, T., Dunlap, J. C. & Goodwin, S. F. (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 90, pp. 133-208); Academic Press.
- Wagner, E. G. H., & Simons, R. W.** (1994) Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol*, 48(1), 713-742.
- Wagner, S. D., Kugel, J. F., & Goodrich, J. A.** (2010) TFIIF facilitates dissociation of RNA polymerase II from noncoding RNAs that lack a repression domain. *Mol Cell Biol*, 30(1), 91-97.
- Wagner, S. D., Yakovchuk, P., Gilman, B., Ponicsan, S. L., Drullinger, L. F., Kugel, J. F., & Goodrich, J. A.** (2013) RNA polymerase II acts as an RNA-dependent RNA polymerase to extend and destabilize a non-coding RNA. *EMBO J*, 32(6), 781-790.
- Walters, R. D., Kugel, J. F., & Goodrich, J. A.** (2009) Invaluable junk: The cellular impact and function of Alu and B2 RNAs. *IUBMB Life*, 61(8), 831-837.
- Wang, Z., Xu, Y., Yang, Z., Hou, H., Jiang, G., & Kuang, T.** (2002) Effect of sodium thiosulfate on the depletion of photosynthetic apparatus in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 cells grown in the presence of glucose. *Photosynthetica*, 40(3), 383-387.
- Wassarman, K. M.** (2002) Small RNAs in bacteria. *Cell*, 109(2), 141-144.
- Wassarman, K. M.** (2018) 6S RNA, a global regulator of transcription. *Microbiol Spectr*, 6(3).
- Wassarman, K. M., & Saecker, R. M.** (2006) Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science*, 314(5805), 1601-1603.
- Wassarman, K. M., & Storz, G.** (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, 101(6), 613-623.
- Watanabe, T., Sugiura, M., & Sugita, M.** (1997) A novel small stable RNA, 6Sa RNA, from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301. *FEBS Lett*, 416(3), 302-306.
- Waters, L. S., & Storz, G.** (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628.
- Wehner, S., Damm, K., Hartmann, R. K., & Marz, M.** (2014) Dissemination of 6S RNA among bacteria. *RNA Biol*, 11(11), 1467-1478.
- Weissenmayer, B. A., Prendergast, J. G. D., Lohan, A. J., & Loftus, B. J.** (2011) Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. *PLoS One*, 6(3), e17570.

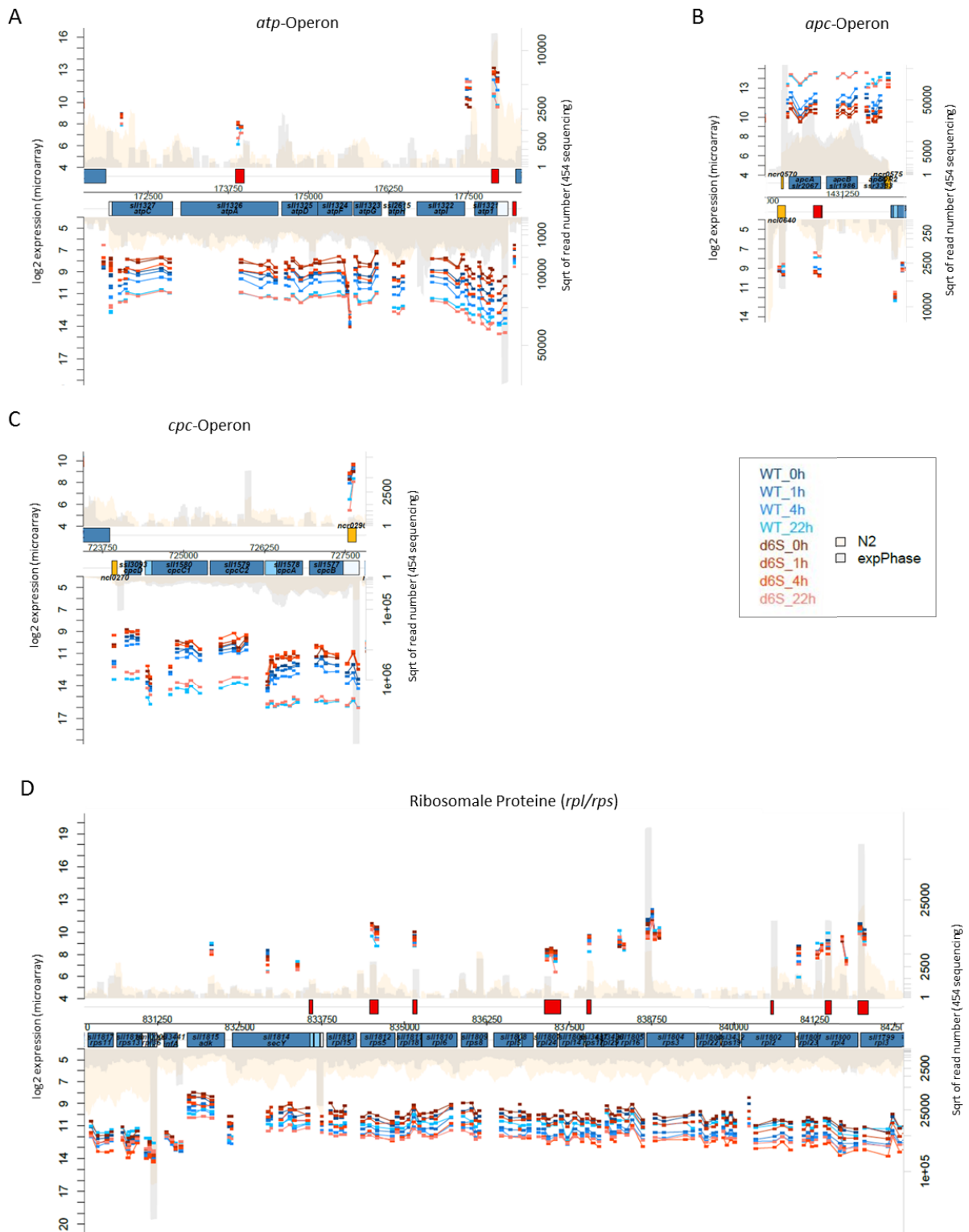
- Wilde, A., & Hihara, Y.** (2016) Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(3), 296-308.
- Wittmershaus, B. P., Woolf, V. M., & Vermaas, W. F.** (1992) Temperature dependence and polarization of fluorescence from Photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res*, 31(2), 75-87.
- Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P., & Elhai, J.** (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(5), 1561-1565.
- Wösten, M. M.** (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*, 22(3), 127-150.
- Wurm, R., Neußer, T., & Wagner, R.** (2010) 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products. *Biol Chem*, 391(2-3), 187-196.
- Yakovchuk, P., Goodrich, J. A., & Kugel, J. F.** (2009) B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(14), 5569-5574.
- Yoshimura, T., Imamura, S., Tanaka, K., Shirai, M., & Asayama, M.** (2007) Cooperation of group 2  $\sigma$  factors, SigD and SigE for light-induced transcription in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*, 581(7), 1495-1500.
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., & Zhang, F.** (2013) Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Mar Drugs*, 11(8), 2894-2916.
- Zavřel, T., Sinetova, M. A., Búzová, D., Literáková, P., & Červený, J.** (2015) Characterization of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 autotrophic growth in a flat-panel photobioreactor. *Eng. Life Sci.*, 15(1), 122-132.
- Zinchenko, V. V., Piven, I. V., Melnik, V. A., & Shestakov, S. V.** (1999) Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Russ J Genet*, 35(3), 228-232.
- Zuker, M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3406-3415.



## Anhang



**Abbildung A.1 Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* Wildtyp,  $\Delta$ ssaA-C- und 6S(+)-Mutante während der Regeneration nach Stickstoffmangel.** Flüssigkulturen der verwendeten Stämme wurden für vier Tage unter Standardbedingungen (30 °C, bei konstanter Belichtung mit 40-60  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in 1 x BG11-Medium zu je 35 ml in Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit stickstoff-freiem Medium (BG11-Medium -N) für sieben Tage unter Stickstoffmangelbedingungen (-N) kultiviert (Zeitpunkt 0h +N). Die durch die Zugabe von 17,6 mM  $\text{NaNO}_3$  initiierte Regeneration der Zellen wurde durch Messung der Lichtabsorptionsspektren zu den Zeitpunkten 4h, 22h und 48h nach Stickstoffzugabe (+N) ermittelt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden Flüssigkulturen von Wildtyp- (WT) und  $\Delta$ ssaA-C-Zellen (A) sowie WT- und 6S(+)-Zellen (B) analysiert. Die Spektren wurden auf die  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  normiert.



**Abbildung A.2** Genomische Einordnung der unter Stickstoffmangelbedingungen und während der Regeneration regulierten Genabschnitte in *Synechocystis*. Die normierten log2 Expressionsdaten der vergleichenden *Microarray*-Analyse (Abschnitt 2.2.7.2) der beiden Stämme  $\Delta$ *ssaA* und WT, die zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 4h und 22h +N ermittelt wurden, sind in ihrem genomischen Umfeld für die folgenden Genabschnitte exemplarisch dargestellt: **A:** *atp*-Operon (ATP-Synthase), **B:** *apc*-Operon (Allophycocyanin), **C:** *cpc*-Operon (Phycocyanin) und **D:** *rpl/rps* (Ribosomale Proteine). Verändert nach Heilmann *et al.* (2017).

## Abkürzungsverzeichnis

A, C, G, T, U	Nukleinbasen der DNA und/oder RNA
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
asRNA	<i>antisense</i> RNA
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Chl	Chlorophyll <i>a</i>
Cl	Chloroform/Isoamylalkohol
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
c	Zenti ( $10^{-2}$ )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytosintriphosphat
d	Tag/e
Da	Dalton
d.h.	das heißt
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser ( <i>Aqua dest.</i> )
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Na-Deoxycholat
<i>dRNA-seq</i>	<i>differential RNA sequencing</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	<i>extracytoplasmic function</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lat.: und andere)
FC	<i>foldchange</i> (x-fache Veränderung)
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
His (HIS)	Histidin
HSP	Hitzeschockprotein(e)
IMAC	<i>Immobilized-metal affinity chromatography</i>
K	Kelvin
k	Kilo
Km	Kanamycin
l	Liter

LNA	<i>locked nucleic acid</i> ; Synthetisches RNA-Analogon, bei dem die Ribose-Einheit über eine zusätzliche Brücke mit dem Ribose-Ring verknüpft ist.
log	Logarithmus
M	Marker, bzw. Mega ( $10^6$ ), bzw. Molar ( $\text{mol l}^{-1}$ )
m	Meter, bzw. Milli ( $10^{-3}$ )
min	Minute/n
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Stickstoff
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NAD(P)	Nikotinamidadenindinukleotid(Phosphat)
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
ppGpp	Guanosin-3',5'-bisphosphat
pRNA	<i>product RNA</i>
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RuBisCo	Ribulose-Biphosphat-Carboxylase
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsilfat
sek	Sekunde/n
Sig ( $\sigma$ )	Sigmafaktor
sp.	Spezies
sRNA	<i>small RNA</i>
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
TCA	Trichloressigsäure
tmRNA	<i>transfer-messenger RNA</i>

tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	Unit
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
°C	Grad
[ <sup>32</sup> P]	Radioaktives Phosphorisotop
-N	Stickstoffmangelbedingungen
+N	stickstoffkomplementierte Bedingungen



## Danksagung

Herrn Prof. Christian Schmitz-Linneweber danke ich für die Übernahme der Koreferenz dieser Arbeit.

Der allergrößte Dank gilt meiner Doktormutter Frau Jun.-Prof. Ilka Axmann. Vielen Dank für die exzellente Betreuung, für die vielen inspirierenden und motivierenden Diskussionen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich einen Teil meiner Arbeit in Finnland durchführen konnte.

Besonders freue ich mich, dass Herr Prof. Rolf Wagner für die Begutachtung dieser Arbeit zugesagt hat - der mich bereits im ersten Semester meines Studiums in der Vorlesung zu „Zell- und Molekularbiologie“ und später im Rahmen meiner Diplomarbeit für die bakterielle Transkriptionsregulation begeistern konnte. Vielen Dank!

In diesem Zusammenhang auch ein großes Dankeschön an Reini für ihre Hilfe bei den ersten Versuchen, die RNA Polymerase aufzureinigen.

Many thanks to Taina Tyystjärvi, who was always willing to share her vast knowledge about cyanobacterial RNA polymerase and to discuss the latest Western Blot results. Thank you for introducing me to the beautiful and relaxing Finnish lifestyle. Special thanks to Kaisa and Satu for your support with the experiments.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Wolfgang Hess und Herrn Dr. Jens Georg für die Durchführung der *Microarray*-Experimente und die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an meine ehemaligen Berliner Kolleg(inn)en Anika, Tim, Christian, Anne R., Adrian und Stefanie für viele interessante wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen und unvergessene Ausflüge in das Berliner Umland.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Wolfgang Lockau sowie meinen ehemaligen Kolleg(inn)en der Biochemie, insbesondere bei Friederike, Marianne, Thomas und Anne K., von denen ich sehr viel über Cyanobakterien lernen durfte und deren Anregungen zum Gelingen meiner Experimente beigetragen haben.

Vielen Dank an meine ehemaligen Düsseldorfer Kolleg(inn)en Anika, Dennis, Sabine, Nic, Rainer und Anna B. für die schöne Arbeitsatmosphäre – in dem doch recht kleinen Labor.

Natürlich gilt ein großer Dank auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte und Unterstützung.

Der liebste Dank gilt meiner Mutter und Daniel: Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer für mich da seid!





## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde bei keiner weiteren Prüfungsbehörde eingereicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 27. Juni 2012 ist mir bekannt.

Berlin, den 19.02.2019

Beate Heilmann



## Publikationsliste

**Heilmann, B.**, Hakkila, K., Georg, J., Tyystjärvi, T., Hess, W.R., Axmann, I.M., Dienst, D. (2017) 6S RNA plays a role in recovery from nitrogen depletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Microbiology*, 17:229. DOI: 10.1186/s12866-017-1137-9

Beck, C., Hertel, S., Rediger, A., Lehmann, R., Wiegand, A., Kölsch, A., **Heilmann, B.**, Georg, J., Hess, W.R. and Axmann, I.M. (2014) A daily expression pattern of protein-coding genes and small non-coding RNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 5195-5206. DOI: 10.1128/AEM.01086-14.

Rediger, A., Geissen, R., Steuten, B., **Heilmann, B.**, Wagner, R. and Axmann, I.M. (2012) 6S RNA - an old issue became blue-green. *Microbiol.*, 158, 2480-2491. DOI:10.1099/mic.0.058958-0

### Konferenz-Poster

**Heilmann, B.** und Axmann, I. M. (2014) Investigating the role of 6S RNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in nitrogen stress response. *9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria*, 07. 09. - 11. 09. 2014 in Texel, Niederlande

**Heilmann, B.**, Rediger, A., Wagner, R. und Axmann, I. M. (2013) Functional investigation of 6S RNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to light alterations. *3<sup>rd</sup> International Conference on Regulating with RNA in Bacteria*, 04. 06. - 08. 06. 2013 in Würzburg, Deutschland

**Heilmann, B.**, Rediger, A., Wagner, R. und Axmann, I. M. (2013) Functional investigation of 6S RNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to light alterations. *ESF-EMBO Symposium - Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: Shaping The Environment*, 15. 04. - 20. 04. 2013 in Pultusk, Polen

**Heilmann, B.**, Rediger, A., Geissen, R., Wagner, R. und Axmann, I. M. (2012) Does 6S RNA balance the transcriptional network of cyanobacteria? *14<sup>th</sup> International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*, 05. 10. - 10. 08. 2012 in Porto, Portugal

## Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.